



**Diana Filipa Lopes
Taveira Gomes**

**Detecção do Ag HLA-B27 por Citometria de Fluxo e
PCR GenoQuick**



**Diana Filipa Lopes
Taveira Gomes**

**Detecção do Ag HLA-B27 por Citometria de Fluxo e
PCR GenoQuick**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular realizada sob orientação científica do Dr. António Manuel Bastos Marques, Médico Imunohemoterapeuta no Hospital de Braga e Prof. Dr^a. Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Dr ^a . Maria do Céu Gomes dos Santos Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro
--

vogal

Prof. Dr ^a . Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro
--

vogal

Lic ^o António Manuel Bastos Marques Médico Especialista em Imunohemoterapia no Hospital de Braga
--

vogal

Mestre Luísa Isabel Dá Mesquita Pinto Ferreira Técnica Superior de Laboratório no Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima

agradecimentos

Para a elaboração deste projecto, foi necessário e importante a cooperação de um grupo de pessoas que contribuíram para a sua concretização, bem como, a contribuição no percurso de evolução e aquisição de novos conhecimentos. Assim cabe-me reconhecidamente agradecer:

Com grande estima, ao Dr. José Luís de Lima, director geral do Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima pela sua prontificação em ceder-me as instalações para a realização prática do projecto e pelo seu apoio ao longo deste.

À Iberlab & Imunoreage, que apadrinhou a realização dos testes pela PCR GenoQuick, bem como, aos seus colaboradores que sempre se prestaram a todos os esclarecimentos necessários desde o início até ao fim do projecto.

Aos orientadores da dissertação, ao Dr. António Marques pela sua disponibilidade, apesar dos compromissos profissionais. À Doutora Ângela Cunha pela acessibilidade, paciência, perspicácia e simpatia com que me acolheu desde o primeiro dia, que teve uma contribuição fundamental no percurso de evolução deste trabalho.

De seguida à Dra. Sofia Isabel Torres pela sua ajuda incondicional e incentivo constante, essencial para eu conseguir ultrapassar todas as dificuldades e continuar o projecto. Não menos importante foi a ajuda da Dra. Luísa Isabel Ferreira, a principal instigadora do tema do projecto, sempre prestativa e optimista. Obrigada a ambas por acreditarem em mim.

E por último, pois não seria possível concluir sem o fazer, um especial agradecimento à minha família; aos meus pais, irmã, avó materna e namorado pela paciência, entusiasmo e apoio que mais uma vez, anuncia uma nova etapa da minha vida, que representa não só uma meta mas também um novo ponto de partida. Onde a única certeza é que aqueles que me amam continuaram junto de mim nos momentos mais importantes da vida, pois aquilo que nos liga, não é simplesmente um músculo – “O coração respira é o único órgão que pulsa, e é essa pulsação que nos permite estar em sintonia,” formando pulsações maiores.

palavras-chave

antigénio HLA-B27, MHC, polimorfismo, espondiloartropatias, espondilite anquilosante, citometria de fluxo, PCR - GenoQuick, fenotipagem, genotipagem.

resumo

Descoberto na década de 70, o antígeno leucocitário humano (HLA) e a sua relação com as rejeições de órgãos e tecidos transplantados, desde cedo despertou interesse na comunidade científica. Estas moléculas extremamente variáveis, agrupam-se em três classes. As classes I e II têm afinidades estruturais e partilham funções da regulação do sistema imune. As proteínas, da classe III, assumem diferentes funções e não estão estruturalmente relacionadas entre si.

O mecanismo de patogénese envolvendo as EAP do *HLA-B27*, permanece largamente desconhecido, apesar de se saber que a sua principal função imunológica é a de ligar peptídeos antigénios e apresentá-los aos linfócitos T. Porém novas hipóteses estão a ser equacionadas, designadamente a acção protectora que alguns subtipos alélicos parecem conferir aos seus portadores. Este trabalho foca o gene *HLA-B27* enquanto fator envolvido em doenças auto-imunes, como as EAP. Entre estas, destaca-se a espondilite anquilosante, com uma prevalência deste antigénio de cerca de 90% em indivíduos caucasianos, sendo o sexo masculino cinco vezes mais afectado. A análise do gene *HLA-B27* não é apenas relevante nos indivíduos sintomáticos, mas também em indivíduos assintomáticos aparentados com portadores da doença, que apresentem o fenótipo e risco acrescido de desenvolverem doença. A importância da detecção da molécula da classe I codificada pelo *HLA-B27* o mais precocemente possível relaciona-se com a vantagem de iniciar a terapêutica adequada o mais breve possível.

O objectivo geral deste trabalho é comparar a abordagem fenotípica correspondente à análise por citometria de fluxo (CF), com a abordagem genotípica correspondente à detecção por PCR com o kit GenoQuick, no estudo de alterações de expressão do gene *HLA-B27* e avaliar o valor das duas abordagens no diagnóstico molecular das espondiloartropatias (EAP).

Os resultados obtidos permitem concluir que o método baseado em PCR revelou maior sensibilidade, produzindo um maior número de casos positivos uma vez que a análise por PCR deteta sequências no DNA correspondentes às várias formas alélicas enquanto que a análise por citometria deteta os antigénios resultantes da expressão dos genes.

keywords

HLA-B27, MHC, polymorphism, spondyloarthropathies, ankylosing spondylitis, flow cytometry, PCR - GenoQuick, phenotyping, genotyping.

abstract

Discovered in the 70s, the human leukocyte antigen (HLA) is involved in the rejection of transplanted organs and tissues and since then, it has drew the attention of the scientific community. These molecules are highly variable and can be divided in three classes. The classes I and II are structurally related and share common functions of regulation of the immune system. The class III proteins, have different functions and are not structurally related to each other. The mechanism of pathogenesis involving HLA-B27 in the spondyloarthropathies (SPA) remains largely unknown, although the role of HLA-B27 in connecting peptide antigens and presenting them to T lymphocytes is clearly demonstrated. New functions, such as the protective action that some allelic subtypes seem to provide to their carriers, are being explored as new hypotheses.

This work focuses on the gene HLA-B27 as a factor involved in autoimmune diseases, such as SPA from which ankylosing spondylitis emerges as a relevant pathology. The prevalence rate of this antigen in caucasian populations is approximately 90 %, being men approximately five times more affected than women. This analysis of HLA-B27 alleles or their expression product is not only relevant in symptomatic individuals, but also in asymptomatic individuals, and especially among the relatives of patients with the disease, because they represent an elevated risk of the disease. It is desirable that the detection of this class I molecule is achieved at the most early stage possible and that an adequate therapy can be initiated.

The objective of this work was to assess the value of the phenotypic analysis by Flow Cytometry (FC), with genotypic analysis by PCR with the kit GenoQuick, in the study of changes in expression of HLA-B27 and in the molecular diagnosis of (SPA).

The results show that the genotypic approach based on PCR provides greater sensitivity, producing a larger number of positive results because it detects sequences in the DNA corresponding to various allelic forms while the cytometric analysis detects the antigenic protein resulting from expression of genes.

Índice

Capítulo I – Introdução	10
1.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade	11
1.1.1 Classes do MHC	11
1.1.2 Polimorfismo do HLA	12
1.1.3 Função do MHC – Processamento e Apresentação do Antígeno	14
1.1.4 Hereditariedade dos Haplótipos dos Ag HLA	15
1.2 Características do Complexo HLA – B27	15
1.3 HLA e Doenças Associadas	18
1.3.1 Espondiloartropatias	19
1.3.1.1 Espondiloartropatias Indiferenciadas	22
1.3.1.2 Síndrome de Reiter /Artrite Reactiva	22
1.3.1.3 Uveíte Anterior	23
1.3.1.4 Artrite Psoriática	23
1.3.1.5 Espondilite Anquilosante	24
1.4 Fisiopatologia do HLA-B27 com a EAP	25
1.4.1 Péptido Artritogénico	25
1.4.2 Mimetismo Molecular	26
1.4.3 Aumento do Nível de Expressão do HLA-B27	26
1.4.4 Alteração do Self	26
1.4.5 Deposição de $\beta 2$ microglobulina	26
1.4.6 HLA-B27 e Resposta Celular ao Stress	27
1.5 Método de Detecção do HLA-B27	27
1.5.1 Microlinfotoxicidade	27
Capítulo II – Objetivos	29
Capítulo III – Material e Métodos	30
3.1 Fundamentação Teórica	30
3.1.1 Citometria de Fluxo	30
3.1.1.1 Estrutura Básica de um Citómetro de Fluxo	30
3.1.1.2 Fenotipagem – HLA-B27	33
3.1.2 PCR GenoQuick	33
3.1.2.1 Extração de DNA	35

3.1.2.2 Mistura de Amplificação	35
3.1.2.3 Protocolos de PCR	36
3.1.2.4 Análise dos Produtos de Amplificação	36
3.1.2.5 Interpretação de Resultados	37
3.2 Procedimentos	38
3.2.1 População e Amostra	38
3.2.2 Colheita de Amostras	38
3.2.3 Citometria de Fluxo	38
3.2.3.1 Pré – tratamento da Amostra	38
3.2.4 PCR-GenoQuick	39
3.2.4.1 GENO-CARD	39
3.2.4.2 Mistura de Amplificação	39
3.2.4.3 Hibridação GenoQuick HLA-B27 Ciclo da PCR	40
IV – Resultados e Discussão	41
V – Conclusão	43
VI – Bibliografia	44
ANEXOS	49

Lista de Abreviaturas

Ac	– Anticorpo
Ag	– Antigénio
AP	– Artrite Psoriática
$\beta 2$ m	– Beta microglobulina
CC	– Controlo de Conjugado
CF	– Citometria de Fluxo
DNA	– Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
EA	– Espondilite Anquilosante
EDTA	– Ethylenediamine Tetraacetic Acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EAP	– Espondiloartropatias
EASN	– Espondiloartropatias Seronegativas
FSC	– Forward Scatter (Luz Frontal)
GQ	– GenoQuick
HIV	– Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
LHL	– Laboratório Hilário de Lima
mL	– Mililitro
ONDOR	– Observatório Nacional das Doenças Reumáticas
OMS	– Organização Mundial de Saúde
PCR	– Polymerase Chain Reaction (Reacção de Polimerase em Cadeia)
PMT	– Fotomultiplicadores
PNM	– Primer Nucleotide Mix
RB	– Running Buffer Tampão de Corrida
SI	– Sistema Imunitário
SIDA	– Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SSC	– Side Scatter (Luz Lateral)
TCR	– Recetor da célula T



Capítulo I – Introdução

Jean Dausset, George Davis Snell e Baruj Benacerraf, juntos partilharam o Prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1980, pela descoberta de proteínas na superfície celular dos leucócitos. ^{(1) (2)}

Comum em todos os mamíferos, o Complexo Principal de Histocompatibilidade – MHC (Major Histocompatibility Complex) – designado nos humanos por Antígeno Leucocitário Humano – **HLA** – (Human Leukocyte Antigen), é uma molécula com pequenas estruturas proteicas que se encontram “como antenas” na superfície celular de células nucleadas, está diretamente relacionada com a rejeição de órgãos, transfusões e pela compatibilidade de tecidos, bem como a regulação da resposta imune do organismo, no reconhecimento do “self” e do “non-self”. ^{(2) (3)}

O meio ambiente está repleto de agentes infecciosos, que se apresentam de diversas formas ao organismo humano, logo a necessidade de um sistema imune com amplas respostas de controlo. Assim, tem-se dois tipos de resposta, a inata ou não adaptativa e a resposta imune adaptativa. ⁽⁴⁾

A primeira linha de defesa, pertence ao sistema imune não adaptativo, caracterizada pela atuação de células fagocitárias (macrófagos, monócitos e neutrófilos polimorfonucleares) aquando da exposição de um microorganismo. Esta resposta não se altera com a exposição repetida de um mesmo agente infeccioso, por isso mesmo é inespecífica. Por outro lado, tem-se o sistema imune adaptativo, que é auxiliado pelos linfócitos T e linfócitos B, onde cada um deles apresenta na sua superfície recetores capazes de reconhecer um só antígeno (Ag) ou mais exatamente uma pequena região deste Ag designada de epítoto. Caracteriza-se por ter memória e ser altamente específico, pois após cada contacto com o agente estranho, torna-se cada vez mais rápido e eficiente. ^{(2) (4)}

As moléculas HLA, são codificadas por um segmento do genoma, que se encontra no braço curto do cromossoma 6 humano, ocupando o segmento designado 21.3, que comporta 3,5 milhões de bases nucleotídicas e contém mais de 220 genes com diferentes funções, dividindo-se em três regiões, denominadas de classes (Figura 1). Iniciando no centrómero para a outra extremidade do cromossoma – região telomérica, depara-se com os genes tipo II, em seguida os de tipo III e por último os de tipo I (clássicos), mais longe ainda, situam-se os genes ditos não clássicos (ex. o HLA-G). ⁽²⁾

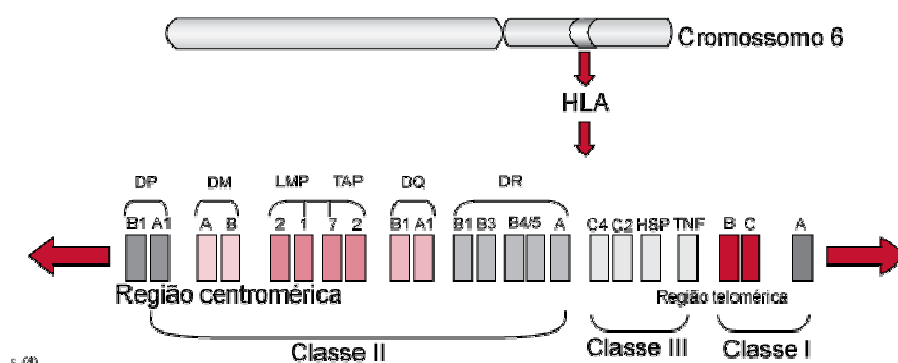


Figura 1: Representação génica do MHC humano, identificando os genes HLA classe I, classe II e os de classe III. ⁽⁵⁾

1.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade

1.1.1 Classes do MHC

As moléculas, da classe I, contêm uma cadeia pesada glicosilada, ligada não covalentemente à β 2-microglobulina e um polipéptido que também pode ser encontrado livre no soro. A cadeia pesada divide-se em três domínios extracelulares, denominados α 1, α 2 (estes dois domínios constituem a fenda de ligação) e α 3, uma região transmembrana e uma caudal citoplasmática. Diferenciam-se três locus – HLA-A, HLA-B e HLA-C (apesar de detalhadas pesquisas indicar a existência de incontáveis genes de classe I, tais como, o HLA-E, HLA-F e HLA-G). ⁽³⁾ ⁽⁴⁾ Encontram-se na maior parte das células nucleadas têm como função, a apresentação de Ag aos linfócitos T, onde após o reconhecimento ocorre a destruição das células alvo reconhecidas como não próprias. ⁽⁴⁾

Na classe II encontram-se moléculas heterodimétricas de cadeias leves (α) e pesadas (β), ambas parecem partilhar a mesma estrutura, onde uma porção extracelular com dois domínios se encontra ligada por uma sequência curta a uma região transmembrana de aproximadamente 30 resíduos e na cauda citoplasmática de aproximadamente 10-15 resíduos. ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾ A fenda de ligação das moléculas desta classe adapta péptidos de maior tamanho comparativamente às de classe I. Os genes estão situados na região HLA-D, existindo três loci DR, DQ e DP que codificam os produtos principais da classe II (com o auxílio de técnicas de mapeamento genético, a ordem de todos os genes conhecidos desta classe já foi determinado). ⁽⁷⁾ Os genes TAP, LMP e HLA-DM codificam proteínas que não são expressas em superfície celular. ⁽⁵⁾ Estas

moléculas estão restritas às células apresentadoras de antígeno (ex., células dendríticas, macrófagos ativados), linfócitos B e em algumas espécies – células endoteliais vasculares e linfócitos T ativados. ^{(4) (6)}

Assim quanto à estrutura do MHC de classe I e II, observam-se semelhanças, estas; possuem três fases: a cistólica (voltada para o interior da célula, responsável pela transdução de sinais intracelulares); a transmembrana (mantém a molécula acoplada à bicamada lipídica) e a extracelular (responsável pela apresentação de peptídeos aos linfócitos T (Figura 2).

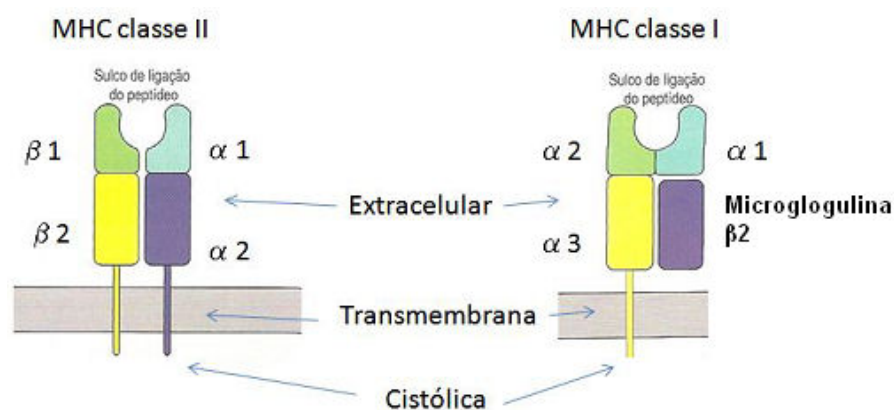


Figura 2: Esquema das estruturas das classes I e II do MHC. (Adap. 37)

Numa última classe, classe III, as moléculas incluem porções do sistema de complemento, não atuando como Ag de transplantes e nem apresentam Ag às células T. Enquanto que todos os produtos génicos de classe I e classe II possuem uma analogia estrutural. Não se encontrou até à atualidade, nenhuma estrutura ou função semelhante entre os produtos génicos de classe III e das moléculas de classes I e II. ^{(6) (7)}

1.1.2 Polimorfismo do HLA

Considera-se polimorfismo, quando as diversas alternativas para um gene ou uma sequência intergénica, têm uma frequência igual ou superior a 1% em determinada população, onde cerca de um terço dos genes apresentam sequências polimórficas. ⁽⁹⁾ As mutações podem ocorrer em sequências de DNA que não são regiões codificantes ou reguladoras, logo não acarretar alterações significativas para o seu portador, que caso existissem traduziam-se em modificações fenotípicas. ⁽²⁾ Os polimorfismos são

considerados, como variações normais e até podem servir como marcadores moleculares, visto serem características únicas para cada indivíduo. ^{(9) (10)}

Os genes que codificam para a molécula HLA são extremamente polimórficos, ou seja, cada gene pode-se apresentar sob múltiplas formas alélicas ⁽³⁾ (variabilidade estrutural), com vários alelos nos loci A, B, C, DR, DQ e DP – “considerando-se alelos as formas alternativas de cada gene, indicando a alteração de um ou mais nucleotídeos na sua sequência, sem haver necessariamente, troca de aminoácidos”. ⁽⁴⁾ Este “grande artesão da evolução” ⁽²⁾ parece ter ocorrido em resposta às pressões evolutivas dos vertebrados e é estratégico para o organismo, uma vez, que o salvaguarda de invasões de microrganismos, assegurando a perpetuação da espécie. ^{(6) (7)} Apesar da proteção que esta diversidade produz, o preço a pagar por vezes é demasiado alto, aquando da rejeição de enxertos entre indivíduos, não aparentados. ⁽²⁾

Atualmente conhecem-se 5.468 alelos da classe I (dos quais 2.329 pertencem ao HLA-B), na classe II contam-se 1591 alelos (Figura 3). ⁽⁸⁾

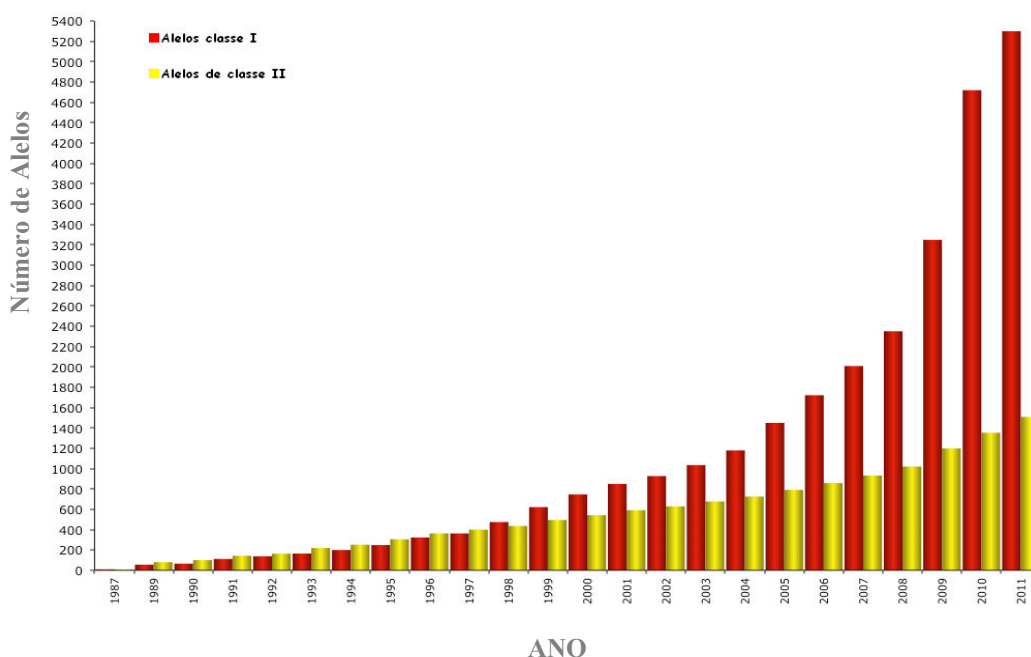


Figura 3 – Gráfico representativo do número de alelos classificados desde 1987 até Julho 2011. (Adap. 8)



1.1.3 Função do MHC – Processamento e Apresentação do Antígeno

Durante quase duas décadas da descoberta do MHC, que a sua única função conhecida era em relação à rejeição de transplantes. Posteriormente, nos anos 80 documentou-se que os genes MHC eram essenciais para todas as respostas imunológicas a Ag proteicos.⁽³⁷⁾

Todas as moléculas HLA trazem no seu sulco um péptido, que será reconhecido por um recetor presente nos linfócitos T (TcR), como pertencente ao “próprio” ou ao “não próprio”, logo estranho ao organismo. Assim se encontra formada a base de defesa imunológica do organismo – molécula HLA, péptido e recetor T.⁽²⁾ O reconhecimento do Ag pelos linfócitos T é indispensável para a formação e regulação de uma resposta imune ajustada. Logo a natureza do TcR decide o reconhecimento específico do Ag.⁽⁴⁾

O TcR é uma glicoproteína heterodimétrica, que possibilita o reconhecimento de uma extensa variedade de Ag pelas células T. Na superfície celular este encontra-se articulado a um complexo de péptidos conhecidos como CD3.⁽⁴⁾

As moléculas de classe I ou de classe II do MHC associadas ao Ag (endógeno ou exógeno), facilitam o reconhecimento pelas células T – os fragmentos péptidos, ligam-se às fendas nos Ag do MHC. A associação péptica / MHC ocorre em diferentes organelos intracelulares. Na via endógena, os péptidos ligados ao MHC classe I, estão presentes no citoplasma da célula, onde seguidamente são transportados através do retículo endoplasmático, migrando para a superfície celular, para a sua apresentação aos linfócitos TCD₈.^{(4) (6)} Já na via exógena, os péptidos são apresentados pelo MHC classe II, as moléculas desta classe conjuntamente com uma cadeia constante (li), são transportadas assim, através do complexo de Golgi, até ocorrer a desagregação da cadeia e o carregamento do peptídeo.^{(4) (6)}

Em suma, a principal função conhecida, das moléculas MHC é a apresentação de péptidos antigénios às células T, e caso os péptidos sejam normais, isto é, não derivarem de nenhum organismo “não próprio”, o sistema imunitário não ataca a célula, mas pelo contrário, os péptidos que o MHC transportou para o exterior pertencerem a células infectadas ou com função prejudica, a célula é destruída.⁽⁶⁾

1.1.4 Hereditariedade dos Haplótipos dos Ag HLA

Designa-se haplótipo a dois alelos de dois genes relativamente próximos, presentes em um único cromossoma. ⁽⁹⁾ Os genes HLA têm a particularidade de muito raramente serem separados por fenómenos de recombinação. ^{(9) (10)} Este “bloco HLA” é por norma transmitido de modo incólume do progenitor para o descendente. ⁽²⁾ (Figura 4) Cada gene HLA pode manifestar dois alelos idênticos nos dois cromossomas, (indivíduo homozigótico), ou pelo contrário dois alelos diferentes (indivíduo heterozigótico), ⁽²⁾ sendo esta última situação a mais frequente, uma vez, que a distribuição dos alelos é bastante diversificada numa mesma população. ⁽³⁾

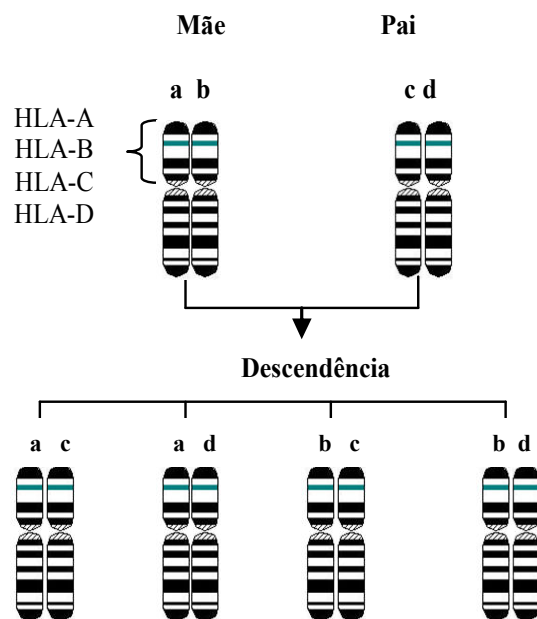


Figura 4: Esquema de um padrão de herança mendeliana simples para “bloco HLA”. (Adap. 4)

Os genes do HLA adotam os padrões de herança mendeliana, assim, existe uma co-dominância de alelos, ou seja, as proteínas codificadas por estes alelos apresentam-se de igual forma na superfície celular. Portanto ambos os haplótipos se manifestam analogamente nos filhos. ^{(2) (4)}

Existindo, então, um total de quatro diferentes combinações, onde um indivíduo tem 25% de hipóteses de herdar os mesmos dois haplótipos como qualquer outro seu irmão, 25% de não herdar nenhum dos haplótipos dos seus irmãos e 50% de hipóteses de compartilhar pelo menos um dos haplótipos com seus irmãos. ⁽³⁾

1.2 Características do Complexo HLA-B27

Comparativamente a algumas moléculas da classe I, as proteínas codificadas pelo grupo de alelos B*27 é particularmente eficaz na apresentação de Ag ⁽²⁾ Estes parecem exercer um papel de destaque na resposta imune a vírus, pois o HLA-B27 parece conferir alguma vantagem evolutiva aos indivíduos positivos para este alelo ⁽³⁹⁾ Provavelmente, confere-lhes a capacidade de apresentar epítomos antigénicos dos

patógenos derivados de células T mais rapidamente e/ ou mais eficientemente, comparado a outros alelos do complexo HLA de classe I, porém esta mesma característica parece também predispor às EAP. ^{(39) (40) (41)}

Cerca de 95% dos indivíduos caucasianos, com a EA são HLA-B*27 positivos, embora com diferentes subtipos. ⁽²²⁾ No entanto, o HLA-B27 representa uma pequena fração para o risco global de desenvolvimento da EA, uma vez que na população geral (sem historia familiar), só 1-5% dos indivíduos HLA-B*27 positivos desenvolvem a doença, aumentando para 20-50% em indivíduos com histórico na família. ^{(22) (23)}

A presença deste gene HLA-B27, parece que por si só, não consegue explicar a recorrência em termos familiares, sendo sugestivo afirmar a existência de outros fatores com um papel de grande relevo ao nível da implicação genética na EA. Este facto, aponta para a possibilidade de outros genes MHC e não MHC concederem suscetibilidade ou condicionarem a expressão fenotípica da doença. ^{(24) (25)}

No interior do sulco, das moléculas HLA, são capazes de se acomodarem diferentes péptidos. Estas fendas de ligação estão organizadas em várias cavidades denominadas comumente de pockets, estas bolsas de ligação variam na sua constituição aminoácida, o que lhes confere especificidade na ligação a diferentes péptidos (Figura 5). ^{(4) (14) (41)}

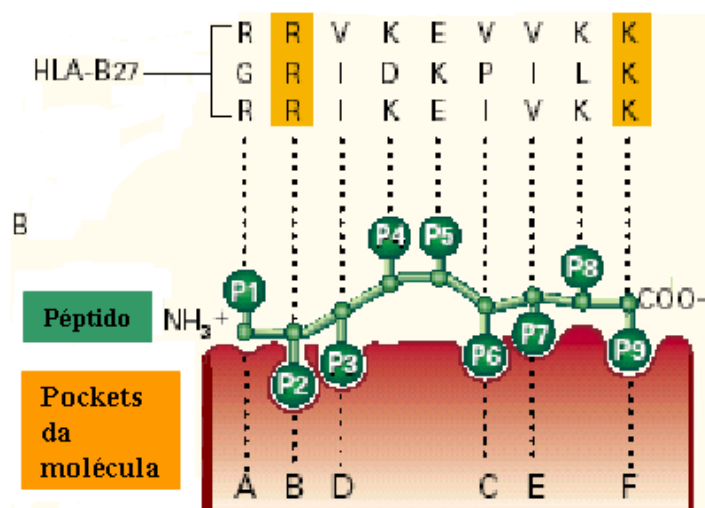


Figura 5: Esquema de interação entre os pockets da molécula HLA-B27 e os resíduos peptídicos. Os resíduos âncora estão assinalados a amarelo. Aminoácidos – ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), glicina (G), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), arginina (R) e valina (V) (Adap.de 14).

No alelo HLA-B27 entre os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ forma-se um sulco, com elevado polimorfismo, que funciona como o local de ligação de péptidos de pequenas dimensões. Este local é composto por seis pockets, identificados de A a F, cada um, com capacidade de interação com os diversos aminoácidos dos péptidos. Os péptidos que se agregam ao HLA-B27 formam entre 7 a 15 aminoácidos, (designados por P1, P2, ...P9), numa configuração linear, que



lhes possibilita a interação direta com os resíduos desta molécula. A direção dos péptidos é fixa observando-se sempre o grupo amina (N-terminal) na mesma extremidade e o grupo carboxilo (C-terminal), na extremidade oposta. ⁽⁴⁾⁽¹⁴⁾

Algumas cadeias laterais, constituídas por aminoácidos situados no meio do péptido, orientam-se para fora das subcavidades e os restantes resíduos encaixam nos *pockets*. Sendo que as cadeias laterais dos resíduos P2 e P9, que interagem com os *pockets* B e F respetivamente, funcionam como âncoras, estabelecendo o tipo de péptido que se liga à molécula (Figura5). ⁽¹⁴⁾

Constantemente são descritas as prevalência geográfica, a frequência e a distribuição dos subtipos do HLA-B27 em diferentes populações e grupos étnicos (o q há novo). O que parece certo é a evolução de todos os alelos B27 a partir de um ancestral genético comum o HLA-B * 2705 visto este se encontrar presente em quase todas as populações. A maioria das publicações, corroboraram os subtipos: HLA B * 2705 como comum em caucasianos e índios americanos, HLA B * 2704 em asiáticos e HLA B * 2702 em populações do Mediterrâneo. Cada um destes alelos mostra uma forte associação com a EA, que também tem sido relatada com outros subtipos raros, incluindo B * 2701, B * 2703, B * 2707, B * 2708, B * 2710, B * 2713, B * 2714, B * 2715, B * 2719 e B * 2725. ⁽¹⁴⁾⁽⁴⁰⁾

Existem relatos em populações de Gregos Cipriotas, onde a EA associada a HLA-B * 2707 poderá garantir proteção contra esta patologia, enquanto que o HLA-B * 2708 pode proporcionar proteção em mestiços, uma vez que foram detetados em indivíduos saudáveis destas populações. Em contrapartida, com outras populações asiáticas como chineses Han e Taiwan chinesa ou japonesa, nos coreanos o subtipo HLA-B27 predominante na associação à EA é o B * 2705, em vez de B * 2704. Já em indivíduos zambianos o HLA-B27 é praticamente ausente em pacientes com EA. ⁽⁴⁰⁾

A hipótese de que o B * 2709 surgiu na região do Mediterrâneo por uma mutação do B * 2705 em um haplótipo associado à baixa suscetibilidade para a EA e que este, haplótipo, é mais importante para predisposição da doença do que as diferenças entre os subtipos B * 2705 e B * 2709. Levaram a estudos epidemiológicos que sugerem que os subtipos HLA-B * 2706 e B * 2709, não estejam associados às EA, podendo ligar a diferentes conjuntos de péptidos. ⁽³⁹⁾ O HLA-B * 2706 difere do B * 2704 por apenas dois resíduos de aminoácidos e B * 2709 difere do B * 2705 por apenas um. No entanto, embora as diferenças nas sequências de aminoácidos que



envolvem o sulco peptídeo de ligação e, conseqüentemente, determinar a especificidade peptídeo poderia contribuir para as diferentes forças de associação com EA, mas mesmo assim, não fornecem a resposta completa. ^{(39) (40)}

1.3 HLA e Doenças Associadas

São nos órgãos linfóides primários que se desenvolvem os linfócitos no organismo. Nos mamíferos as células T amadurecem no timo e as células B, no fígado fetal e na medula óssea, nestes locais as células adquirem tolerância para os Ag próprios do organismo, desenvolvendo a capacidade de reconhecimento de Ag não próprios. No timo, as células T, “aprendem” também a reconhecer as moléculas MHC autólogas (que induzem à autotolerância). ⁽⁴⁾ Porém existe casos em que os linfócitos T deixam de diferenciar o “self”, tornando-se auto-reactivos, como consequência, desenvolvem-se as doenças auto-imunes (Tabela 1). ⁽²⁾


Tabela 1: HLA e doenças auto-imunes. (Adap.11)

	Doenças Auto-imunes	Associação MHC
Sistémicas	Artrite Reumatóide	DRB1*0401, DRB1*0101, DQB1*0302
	Artrite Reumatóide Juvenil	DRB1*1104, DRB1*1602, DRB1*13
	Espondiloartropatias	
	Espondilite Anquilosante	B*2702
	Espondilite Anquilosante Juvenil	B*2705
	Artrite Psoriática	Cw*0602, DRB1*07, B*27 (apenas forma axial)
	Artrite Reactiva ou Síndrome de Reiter	B*27
	Polimialgia Reumática	DRB1*0401, DRB1*0404
	Psoríase	Cw*0602, DRB1*07
	Escleroderma	DRB1*1104, DP*1301
	Lúpus Eritematoso Sistémico	DRB1*03, B*08
	Síndrome de Sjögren's	DRB1*03
	Síndrome de Goodpasture	DRB1*15
	Granulomatose de Wegener	VAP-1, MICA, TAP-1
	Síndrome de Guillain-Barré	DQB1*03
Localizadas	Doença de Behçet's	B*51
	Esclerose Múltipla	DRB1*15
	Doença Celíaca	DQB1*02, DQB1*08
	Doença Inflamatória Intestinal	
	Doença de Crohn	DRB1*01, DRB1*03, DRB1*07,
	Colite Ulcerosa	DRB1*15, HLA-G (expressão), DR07 e DR08 (fenótipo)
	Sarcoidose	BTNL2, DQB1*02
	Diabetes Insulino-dependente (tipo I)	DRB1*03, DRB1*04, DQB1*0201, DQB1*0302
	Tiroidite de Hashimoto (hipotiroidismo)	DQB1*05
	Doença de Graves (hipertiroidismo)	Cw*03, Cw*07, Cw*16, DRB1*03, DRB1*04
	Doença de Addison	DQA1*0501-DQB1*0201, DQA1*0301-DQB1*0302, DRB1*03, DRB1*04
	Hepatite auto-imune	DRB1*13
	Cirrose biliar primária	DRB1*0801-DQA1*0401-QB1*0402,
	Colangite esclerosante primária	DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 (DR3) and HLA-DRB1*1301-DQA1*0103-DQB1*0603 (DR6)
	Artrite de células gigantes (temporal)	DRB1*0401, DRB1*0404

1.3.1 Espondiloartropatias

Espondiloartropatias (EAP), também designadas como EAP seronegativas, são um grupo de doenças inflamatórias, crónicas, auto-imunes.



Em 1974 os pesquisadores ingleses Moll e Wright, estabeleceram o conceito de EAP seronegativas, aquando da proposta de abranger dentro de um mesmo grupo algumas patologias que até então eram vistas como distintas entre si, mas que na realidade reúnem diversas características em comum. Estas características abrangem aspetos clínicos, como, a dor axial inflamatória associada à artrite e entesopatias (entesites periféricas), aspetos radiológicos (sacroilíte) e aspetos laboratoriais (seronegatividade para o factor reumatóide).⁽²³⁾

Incluído neste conjunto a espondilite anquilosante (EA), a artrite psoriática, a artrite recativa, a síndrome de Reiter, e as artropatias enteropáticas (associadas às doenças inflamatórias intestinais).^{(12) (13)}

Apesar das particularidades que acompanham cada patologia, as EAP, normalmente apresentam idêntica sintomatologia, tal como; dor nas nádegas alternante (geralmente à noite e em repouso), dor na coluna (por norma à noite e em repouso), artrite normalmente das articulações dos membros inferiores, inflamação do local onde o tendão liga ao osso (entesite), acometimento de órgãos – olhos (uveíte), intestino (colite), e mais raramente acometimento cardíaco e pulmonar.⁽¹⁴⁾

A tabela a seguir (Tabela 2) apresenta um resumo dos resultados de um estudo populacional, que estimam a frequência de EAP em Portugal, com datas de publicação entre 2000 e 2009.⁽¹⁵⁾ Em modo geral, os estudos com base populacional, avaliam a prevalência dos genótipos de suscetibilidade para uma doença, numa determinada população, os fatores de risco das mutações somáticas e germinais e através dos estudos de associação, a relação entre alelos de diferentes loci bem como o risco de doença na referida população.⁽¹⁰⁾

**Tabela 2:** Estudos populacionais que estimam a prevalência de EAP em Portugal. ⁽¹⁵⁾

Primeiro autor, ano publicação [referência]	Método de recolha de informação	Definição de caso	População em estudo	Tamanho amostral	Estimativa
Bruges-Armas J, 2002 [43]	Exame clínico	Critérios do European Spondyloarthropathy Study Group para espondilite e critérios de Nova Iorque modificados para espondilite anquilosante	População caucasiana com mais de 50 anos da Ilha Terceira (Açores)	490	<u>Prevalência de espondilite</u> Ambos os sexos: 1,6% (IC95%: 0,8-2,7) H: 2,7% (IC95%: 1,1-5,6) M: 0,4% (IC95%: 0,0-2,5) <u>Prevalência de espondilite anquilosante</u> Ambos os sexos: 0,6% (0,1-1,8) H: 1,2% (IC95%: 0,2-3,4) M: 0,0% (IC95%: 0,0-1,6)
Costa L, 2004 [22]	Entrevista presencial	História de diagnóstico médico de espondilite anquilosante ou artrite psoriática (auto-declarada)	População adulta residente na cidade do Porto	1 238	<u>Prevalência de espondilite anquilosante</u> Ambos os sexos: 0,6% (IC95%: 0,3-1,3) H: 0,4% (IC95%: 0,1-1,8) M: 0,8% (IC95%: 0,3-1,7) <u>Prevalência de artrite psoriática</u> Ambos os sexos: 0,0% (IC95%: 0,0-0,4) H: 0,0% (IC95%: 0,0-1,1) M: 0,0% (IC95%: 0,0-0,6)
ONDOR, 2007 [67]	Entrevista telefónica	História de diagnóstico médico de espondilite anquilosante ou artrite psoriática (auto-declarada)	População adulta residente em Portugal Continental, com telefone fixo da Portugal Telecom	980	<u>Prevalência de espondilite anquilosante</u> Ambos os sexos: 1,5% (IC95%: 0,8-2,5) <u>Prevalência de artrite psoriática</u> Ambos os sexos: 0,4% (IC95%: 0,1-1,0)
ONDOR, 2009 [não publicado]	Entrevista presencial e exame clínico	Exame clínico e radiográfico sugestivo de espondilartropatia	População adulta residente na cidade do Porto	1 682	<u>Prevalência de espondilartropatia:</u> H: 0,5% (IC 95%: 0,1-1,4) M: 0,1% (IC95%: 0,0-0,5)

O tratamento não medicamentoso como a prática de atividade física de baixo impacto, como a natação, alongamentos ou a fisioterapia, são essenciais para preservar a função da coluna. Para o tratamento medicamentoso inclui-se drogas que aliviam a dor e rigidez, como os anti-inflamatórios não esteróides (AINE), corticosteróides, drogas imunossupressoras que tentam diminuir a atividade imunológica. ⁽¹⁴⁾

Tabela 3: Prevalência do HLA B27 nas EAP em indivíduos caucasianos. ⁽¹⁶⁾

Espondiloartropatia	Doentes com Ag HLA B27 positivam (%)
Espondilite anquilosante	90
Síndrome de Reiter	70-80
Outras artrites reactivas	50-80
Artrite psoriática – forma axial	50



1.3.1.1 Espondiloartropatias Indiferenciadas

As EAP indiferenciadas englobam um grupo de pacientes que apresentam características clínicas e/ou radiológicas sugestivas de uma EAP, mas que não preenchem os critérios diagnósticos suficientes para nenhuma das doenças definidas dentro do grupo, sendo muitas das vezes o diagnóstico provisório de uma EAP definida.⁽¹⁷⁾

Estudos controlados de longo prazo indicaram que um paciente com dor inflamatória em sacroilíacas pode demorar até 14 anos para desenvolver uma sacroilíte radiológica, permitindo o diagnóstico de espondilite (EA).⁽¹⁹⁾ A presença do HLA-B27 representa um fator prognóstico de evolução para uma doença definida.⁽²⁰⁾

O tratamento é o mesmo das doenças definidas dentro do grupo, enfatizando-se que as formas indiferenciadas costumam ter um curso evolutivo mais leve e com menos complicações que as outras doenças do grupo.⁽²⁰⁾

1.3.1.2 Síndrome de Reiter /Artrite Reactiva

Bauer e Engleman propuseram em 1942 o termo Síndrome de Reiter⁽¹²⁾ que define uma inflamação das articulações e das uniões dos tendões às mesmas, acompanhada com frequência de inflamação do olho (conjuntivite) e das membranas mucosas (boca, trato urinário, vagina pênis) e por uma erupção cutânea característica constituída por grãos duros e densos especialmente nas plantas das mãos e pés.⁽²¹⁾ A combinação destes sintomas levam à suspeita da presença do síndrome de Reiter, pois caso contrário, os diferentes sintomas dificilmente se manifestarão de maneira simultânea, como é fácil de entender o diagnóstico pode, assim, demorar vários meses.^{(12) (17)} Atualmente o conceito de artrite reativa dentro do grupo das EAP impõe a presença de uma oligoartrite associada à evidência de infecção precedente.⁽²²⁾

Esta síndrome é mais frequente em homens com idades compreendidas entre os 20 e os 40 anos. Os sintomas clínicos habitualmente manifestam-se após uma infecção, podendo levar uma a quatro semanas – na etiologia entérica é comum quadro diarreico, por vezes disentérico, enquanto que na etiologia genito-urinária, ocorre uretrite com sintomatologia leve, já a nível articular verifica-se a ocorrência de oligoartrite assimétrica recorrente, tenossinovites nos dedos e acometimento axial (espondilite).⁽¹¹⁾

Na maior parte dos casos, os sintomas iniciais desaparecem em 3 ou 4 meses; contudo, a artrite ou outros sintomas podem ser reincidente durante vários anos.



Felizmente são poucas as pessoas que sofrem da síndrome de Reiter que ficam permanentemente incapacitadas.⁽¹⁴⁾

O tratamento passa pelo uso de anti-inflamatórios, corticoesteróides e imunossuppressores, como já foi referido anteriormente, porém aquando de infeções entéricas ou do trato genito-urinário é crucial a administração de antibióticos para combater as bactérias frequentes nestes casos (infeções entéricas – *Samonella*, *Shigella* e *Campylobacter*, tracto genito-urinário - *Chlamydia*).⁽²¹⁾

1.3.1.3 Uveíte Anterior

As uveítes anteriores podem ocorrer até 40% em pacientes com espondilite, sendo menos frequentes nas outras doenças do grupo.⁽²⁴⁾ Podem representar o primeiro sintoma clínico de uma EAP indiferenciada.⁽²⁵⁾ Nas formas crónicas, podem-se encontrar alterações no segmento posterior, tais como, vitreíte, edema de mácula e edema do disco ótico.⁽²⁶⁾ A presença do HLA-B27 por norma não indica por si só um pior prognóstico oftalmológico mas sim maior possibilidade de desenvolver sintomas articulares que poderão evoluir para espondilite.^{(27) (28)} Esta patologia, associada ao HLA-B27 são mais frequentes em homens e tendem a aparecer em indivíduos jovens.⁽²⁹⁾

Aquando de uma crise aguda de uveíte anterior de um paciente com EAP o tratamento indicado passa pelo uso de corticosteróide tópico (para diminuir a inflamação) e midriáticos (para dilatar a pupila); o uso de corticoterapia sistémica deve ser reservado aos casos graves e naqueles com grande recorrência de crises.⁽²⁴⁾

1.3.1.4 Artrite Psoriática

A Artrite Psoriática (AP) é uma doença crónica inflamatória das articulações, associada à psoríase, onde a prevalência desta parece ser cerca de 0.1% da população geral.⁽¹³⁾ Apenas na década de 60 é que esta patologia foi reconhecida, pois até então os doentes eram classificados como tendo Artrite Reumatóide ou outras formas de artrite, a idade de início da doença situa-se entre os 30 e 45 anos, atingindo ambos os sexos.^{(13) (29)}

A designação “artrite” refere-se à inflamação das articulações, onde os principais sintomas são a tumefacção, rigidez matinal, dificuldade na mobilização das articulações afetadas e alteração das unhas. Existe um importante relacionamento hereditário, visto que a psoríase e a AP são mais frequentes nos indivíduos que têm história familiar com

estas patologias ou outras EAP. O Ag HLA-B27 associa-se de forma axial (sacroilíaca e espondilítica) à AP o que não acontece na sua forma estritamente periférica. ^{(13) (29)}

A abordagem de tratamentos para a AP é a mesma que para uma outra EAP, podendo contudo variar mediante a gravidade de cada caso, onde por vezes tem que se recorrer à cirurgia ortopédica que normalmente consiste na substituição de uma articulação por uma prótese. ⁽²⁹⁾

1.3.1.5 Espondilite Anquilosante

A terminologia Espondilite Anquilosante (EA) deriva do grego *spondylos* – vértebra, *itis* – inflamação e *ankylos* – anquilose. ⁽³⁰⁾

A EA é uma doença inflamatória crónica de etiologia desconhecida, atinge principalmente as articulações da coluna, que gradualmente vão sendo “soldadas” umas às outras, tornando a coluna

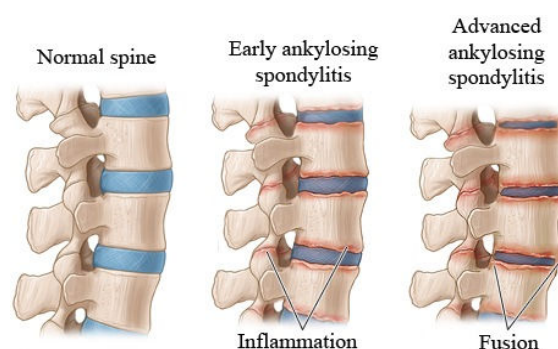


Figura 6: Processo de anquilose – 1. Coluna vertebral saudável; 2. Inflamação; 3. Fusão vertebral. ⁽³⁰⁾

vertebral mais rígida, o que origina uma limitação da mobilidade, logo o termo “anquilosante”, que significa soldagem, fusão (Figura 6). ^{(13) (32)} Esta patologia afeta entre 0.5-1.0% da população e os primeiros sintomas têm início no final da adolescência ou nos jovens adultos, que apesar de atingir ambos os sexos, afeta mais frequentemente os homens (proporções que variam de autor para autor), ⁽¹³⁾ e de forma mais grave por isso julga-se que os fatores hormonais como os níveis de testosterona ou o rácio estradiol/testosterona possam exercer um papel etiopatogénico. ^{(30) (31)}

Lesas particularmente o esqueleto axial, geralmente iniciando-se nas articulações sacroilíacas, a coluna vertebral, as enteses e as articulações periféricas. A característica principal é a presença de sacroilite, em alguns casos ocorre entesopatia inflamatória que pode evoluir progressivamente para ossificação e anquilose. ^{(13) (14)}

Os fatores ambientais, genéticos e hormonais, têm seguramente um papel relevante no aparecimento da EA. ⁽³¹⁾

A influência dos fatores ambientais tem sido fundamentada pela presença de anticorpos (Ac) de certas bactérias (*Klebsiella*, *Shigella* e *Salmonella*) no soro de



doentes com EA, sendo também frequente a presença destas bactérias no organismo destes doentes, nomeadamente nas suas fezes, sugerindo que esta bactéria possa desencadear o processo inflamatório e causar EA. Esta hipótese ainda necessita de validação científica.⁽³⁰⁾

No início da década de 70, estabeleceu-se uma relação entre a EA e o Ag HLA-B27.⁽²⁾ Atualmente estima-se que cerca de 90% dos indivíduos caucasianos com EA são HLA-B27 positivos no entanto, apenas uma pequena parte deste grupo, desenvolve a doença logo conjectura-se o envolvimento de outros fatores genéticos. A EA apresenta uma prevalência de 0,2-0,86% na população caucasiana da Europa Ocidental.^{(13) (15)} Em Portugal, segundo uma publicação de Abril de 2010, do Observatório Nacional das Doenças Reumáticas (ONDOR),⁽¹⁶⁾ a prevalência de EA é de 0,3%.⁽¹⁵⁾

A classificação da EA é baseada em elementos de natureza clínica e radiológica. Atendendo à tendência para anquilose deve-se monitorizar a progressão da doença. Para tal, existem vários métodos de avaliação passíveis de serem utilizados: distância dedos-solo, Shöber, Shöber lateral e expansão torácica.⁽³⁰⁾

O tratamento medicamentoso e não medicamentoso que é aplicado à EA é idêntico a qualquer outra EAP, como o envolvimento de uma equipa multidisciplinar de especialistas ou aplicação de AINE, corticosteróides, inibidores de citocinas em particular de AC monoclonais anti-TNF α representam um importante avanço no tratamento, uma vez que controlam a dor e devolvem a qualidade de vida destes doentes.⁽³⁰⁾

1.4 Fisiopatologia do HLA-B27 com as EAP

A função exata do HLA-B na fisiopatologia da EA e o(s) factor(es) que compreendem a etiologia desta, são aspetos que continuam a serem estudados. Pois apesar dos avanços observados a patogénese das EAP continuam por clarificar. De modo, que existem várias conjecturas que tentam explicar esta associação.^{(14) (33)}

1.4.1. Péptido Artritogénico

Este modelo baseia-se na função natural, das moléculas HLA de classe I, de apresentarem os péptidos endógenos às células T. Após uma infeção por um agente patogénico desencadearia a ligação e apresentação do péptido artritogénico (endógeno)



pelo HLA-B27. A proliferação de clones de células T CD8⁺ conduziria a reações cruzadas e o desencadear da doença.⁽³³⁾

1.4.2 Mimetismo Molecular

Inicialmente descreveu-se que os Ac produzidos para Ag estranhos ao organismo teriam uma reação cruzada com o HLA-B27 o que desencadearia a doença. A teoria da homologia de péptidos, é a reformulação da primeira, aponta para que um péptido artritogénico autólogo seja expresso em níveis baixos. Logo, estímulos infecciosos poderiam sensibilizar as células T para reações cruzadas com o HLA-B27, provocando respostas imunes e consequentemente a doença.⁽³³⁾

1.4.3 Aumento do Nível de Expressão do HLA-B27

Em ratos transgénicos, o grau de suscetibilidade para o desenvolvimento de EAP correlaciona-se com os níveis de expressão do HLA-B27, em termos de mRNA e de proteínas.⁽³⁵⁾ Nos humanos, verifica-se uma maior expressão de moléculas HLA-B27 em doentes com EA do que em indivíduos saudáveis. Foi assim, proposto que o aumento do nível de expressão do HLA-B27 fosse considerado como um fator de suscetibilidade para a EA mas que tal, não se correlacionasse com os índices de atividade ou gravidade da doença.⁽³⁶⁾

1.4.4 Alteração do Self

Esta hipótese baseia-se na alteração da cisteína (Cys67) da proteína B27. A formação de uma ponte bissulfito entre os resíduos de Cys67 originando homodímeros de cadeias pesadas.⁽³⁷⁾ O que pode ocasionar este acontecimento são o excesso de cadeias pesadas ou o défice de β 2 microglobulina (β 2m) Porém desconhece-se ainda o que poderá induzir a ocorrência de EA⁽³³⁾

1.4.5 Deposição de β 2 microglobulina

A dissociação do HLA-B27 na superfície celular poderá levar a uma libertação em baixos níveis de β 2m que, uma vez captada nos fluidos sinoviais e quando depositado nas articulações poderá levar a inflamações crónicas.⁽³⁸⁾



1.4.6 HLA-B27 e Resposta Celular ao Stress

O aumento dos níveis de expressão do HLA-B27 nos doentes com EA poderia determinar um aumento do *misfolding* de cadeias pesadas, uma sobrecarga no RE, a ativação do NF κ B e assim a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1.⁽³¹⁾

1.5 Métodos de Detecção do HLA-B27

Visto a etiologia, não estar claramente definida, os aspetos clínicos e de imagem são considerados indispensáveis, para o diagnóstico de EAP. Em pacientes com quadro clínico sugestivo, mas em fase inicial da patologia, a presença do alelo B27 do complexo HLA colabora de forma significativa para a confirmação do diagnóstico. Assim, as análises laboratoriais, adquiriram um importante papel, logo não é de admirar a evolução de métodos para a deteção do HLA-B27.⁽³⁸⁾

Inicialmente, na rotina laboratorial, a classificação do HLA-B27 só permitia a identificação dos seus Ag, pois efetuava-se a partir de métodos serológicos, tal como a microlinfotoxidade de Terasaki, posteriormente a citometria de fluxo e mais recentemente a PCR (SSP – Sequence-specific Primers e SSOP – Sequence-specific Oligonucleotides Probes).⁽³⁷⁾ Estas duas últimas abordadas neste trabalho (1.5.2 e 1.5.3)^{(37) (38)}

1.5.1 Microlinfotoxidade

O método clássico, microlinfotoxidade deteta reações de citotoxicidade mediada por Ac e dependentes do complemento, baseia-se em soros sensibilizados com Ac anti-HLA conhecido, que é associado com os linfócitos a testar em diferentes poços de placas designadas de placas de Terasaki (descrito por este autor). Uma fonte de complemento, proveniente do soro de coelho, é adicionada aos poços, assim como um corante fluorescente que penetra somente nas células lisadas, aquando da adição de complemento que produz uma modificação na membrana celular. Após um período de incubação, os poços são examinadas sob um microscópio ótico invertido de contraste de fase, onde a presença de células que sofreram lise estarão coradas, indicado uma reacção positiva, ou seja, os linfócitos teste produziram reacção serológica com os Ac homólogos presentes nos anti-soros. Este ensaio permite o uso de um pequeno volume,



tanto das amostras quanto dos reagentes, porém, caiu em desuso devido, às limitações da técnica, que requer células viáveis, dependentes do aloantígeno, de complemento e da expressão dos Ag.^{(37) (42)}



Capítulo II – Objetivos

Comparar a abordagem fenotípica e genotípica na detecção de alterações de expressão do gene HLA-B27 e avaliar o seu valor no diagnóstico molecular das espondiloartropatias.



Capítulo III – Material e Métodos

Para a execução deste estudo foram utilizadas duas metodologias diferentes, uma que até agora era geralmente a mais utilizada na rotina laboratorial, a Citometria de Fluxo e a outra menos habitual nesta rotina, a PCR da GenoQuick.

3.1 Fundamentação Teórica

3.1.1 Citometria de Fluxo

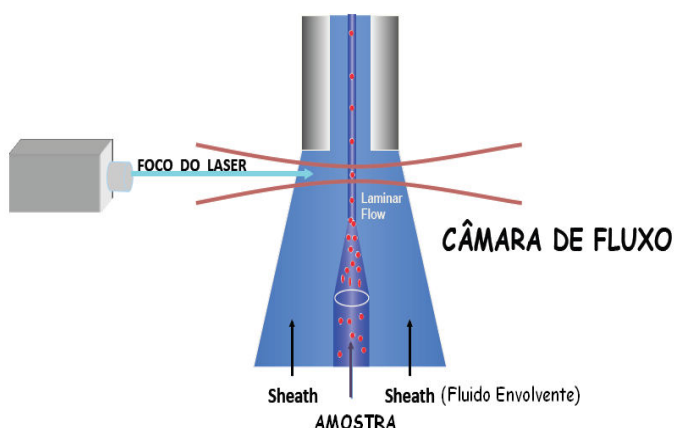
A CF é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas – dispersão da luz e fluorescência – de partículas que fluem numa suspensão líquida. A medição em fluxo permite analisar um elevado número de partículas biológicas (protozoários, bactérias, algas, células sanguíneas, etc.) quanto a várias características em simultâneo, num curto período de tempo. Esta técnica envolve um pré-tratamento das amostras, onde se adiciona Ac conjugados com fluorocromos – estes são moléculas que absorvem luz de um determinado comprimento de onda e emitem num outro comprimento de onda superior.⁽⁴³⁾

3.1.1.1 Estrutura Básica de um Citómetro de Fluxo

O equipamento medidor – citómetro de fluxo, pode-se dividir em três sistemas.

- Sistema Fluídico

Neste sistema após a injeção de amostra, previamente preparada, esta é forçada a passar por uma câmara de fluxo (flow cell) que se encontra preenchida por um fluido envolvente (sheath fluid) com velocidade superior à da amostra. Centralizada num fluxo



contínuo as partículas biológicas, são obrigadas a sair desta câmara uma atrás da outra de modo que apenas uma única célula seja interceptada pelo laser (Figura 7). Ocorrendo dois tipos de fenómenos físicos que fornecem informações acerca da célula: o

Figura 7: Sistema Fluídico da CF. (Adap. 46)



forward scatter (FSC), que deteta a dispersão da luz frontal e Side Scatter (SSC), que deteta a dispersão da luz lateral (reflectida/refractada).⁽⁴³⁾

- **Sistema Ótico**

Sistema constituído por laser e lentes que ajudam na formação e na colecta dos sinais de luz, pois alinham e moldam o feixe do laser.^{(43) (47)}

Uma parte da luz é espalhada de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula (Figura 8). O FSC relaciona-se com o tamanho ou volume relativo (luz dispersa em ângulos pequenos) e SSC com a granularidade ou complexidade interna (luz dispersa em ângulos grandes)

da célula ou partícula. Logo, as células previamente coradas com fluorocromos, uma vez excitadas pelo laser, emitem luz de acordo com suas características fluorescentes. Uma série de lentes colocadas próximas desta zona de intercetção (célula-laser) recolhem a luz dispersa e enviam-na para os detetores (tubos fotomultiplicadores - PMTs). Estes convertem o sinal luminoso em pulsos elétricos, os quais são proporcionais à quantidade de luz dispersa ou fluorescente captada pelos PMT. Para a seleção e captação destes sinais luminosos, os filtros óticos (Figura 9) são utilizados para bloquear determinados comprimentos de onda da luz incidente e deixar passar somente a luz de comprimento de onda desejado.^{(43) (47)}

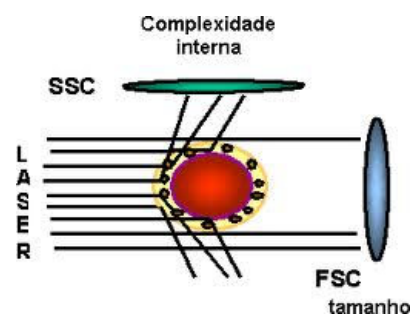


Figura 8: Análise das características físicas da célula. (Adap.45)

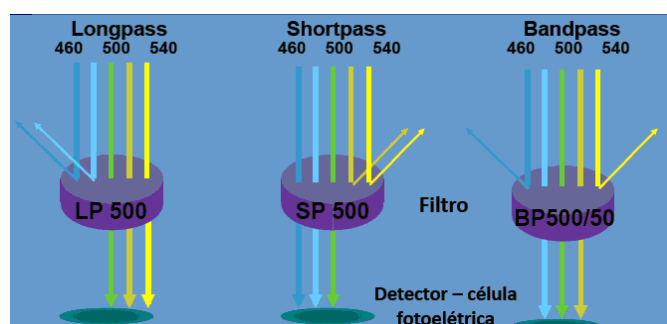


Figura 9: Filtros ópticos. (Adap. 44)

- **Sistema Eletrónico**

Os sinais eléctricos gerados pelos PMT são amplificados, convertidos para um modo digital e as informações enviadas para um computador. A recolha dos dados, a



sua análises e a interpretação podem, então, ser efectuadas através de *softwar* específicos. ^{(43) (47)}

Assim para além do tamanho celular (FSC), granularidade interna das células (SSC), pode-se obter até mais cinco parâmetros; fluorescência verde (FL1); fluorescência amarela (FL2), fluorescência laranja (FL3), fluorescência vermelha (FL4) e fluorescência roxa (FL5), cada um capta luz a um comprimento de onda específico. O valor registado corresponde à altura do pulso de voltagem para cada célula ou evento que pode ser medido para cada parâmetro. ^{(43) (47)}

Os eventos podem ser apresentados numa escala gráfica sob a forma de scatter plots que podem conter mais que um parâmetro (Figura 10). ⁽⁴⁹⁾

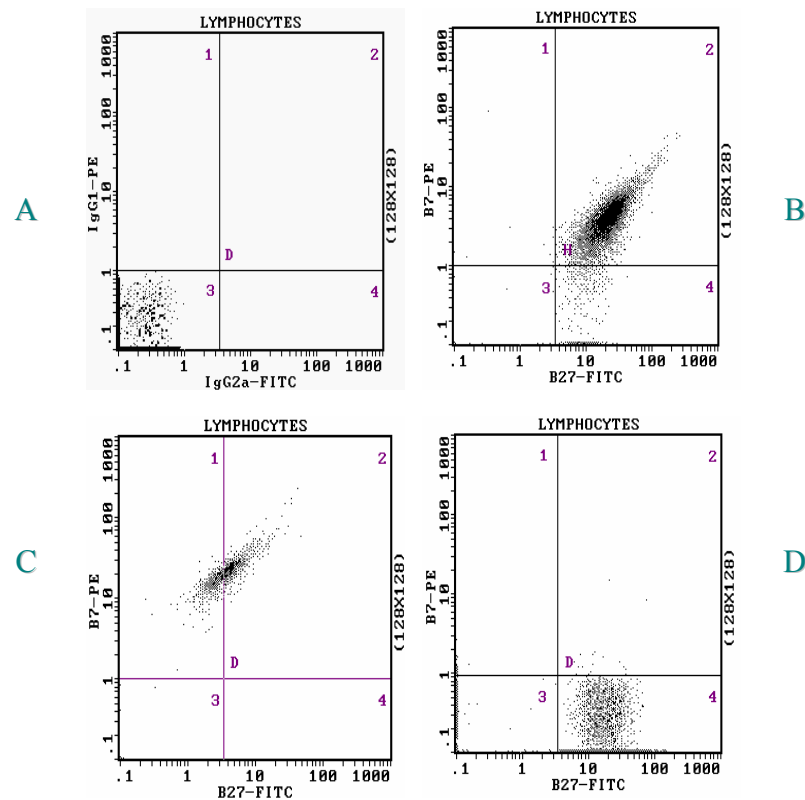


Figura 10: Exemplo de gráficos (scatter plots) produzidos pelo citómetro de fluxo da Beckman Coulter. ⁽⁴⁹⁾

Os critérios de um resultado positivo ou negativo na CF para o estudo em questão são exemplificados na Figura 7. Nos histogramas apresentados, o eixo das ordenadas é representativo do HLA-B7 e o eixo das abcissas do HLA-B27. Assim, o histograma **A** corresponde ao controlo negativo, o histograma **B** a um resultado positivo tanto para o HLA-B27 como para o HLA-B7, o histograma **C** a resultado negativo para



HLA-B27 é positivo para HLA-B7, e o histograma **D** corresponde a um resultado positivo para HLA-B27 e negativo para HLA-B7.

3.1.1.2 Fenotipagem – HLA-B27

	Specification of constituent 1	Specification of constituent 2
Specificity	HLA-B27	HLA-B7
Clone	HLA-ABC-m3	BB7.1
Hybridoma	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Immunogen	HLA-B27 antigen partially purified, extracted from the Bordin line (HLA-B27 ⁺)	HLA-A2, B7 antigen partially purified, obtained by papain cleavage
Immunoglobulin	IgG2a	IgG1
Species	Mouse	Mouse
Source	Ascites	Ascites
Purification	Chromatography	Chromatography
Fluorochrome	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R. Phycoerythrin (PE)
λ excitation	488 nm	488 nm
Emission peak	525 nm	575 nm
Buffer	PBS pH 7.2 plus 2 mg / mL BSA and 0.1% NaN ₃	

Figura 11: Características do reagente IOTest HLA-B27-FITC/ HLA-B7-PE. ⁽⁴⁹⁾

Este método baseia-se na capacidade de determinados Ac monoclonais se ligarem a antígenos (Ag) de superfície, expressos pelos leucócitos (Figura 11). Para se efetuar a fenotipagem do HLA-B27 por CF, tem de se ter em conta que esta molécula faz parte de um grupo com suscetibilidade para reações cruzadas (*cross-reactive groups* – CREG), pois este conjunto partilha os mesmos epítomos. Como o Ag HLA-B27 pertence ao CREG HLA-B7 que inclui, HLA-B7, B13, B22, B40, B40, B41, B42, B47 e B48, isto pressupõe que o Ac monoclonal empregue para a deteção do B27 pode reagir de forma cruzada com o Ag HLA-B7 e com outros Ag do grupo CREG HLA-B7 com menor afinidade. Daí a utilização em simultâneo dos Ac comerciais anti-HLA-B27 e anti-HLA-B7 que permite a deteção de falsos positivos por reacção cruzada. ^{(43) (49)}

Os controlos negativos IgG2a[mouse]-FITC / IgG1[mouse]-PE –são Ac monoclonais com especificidade irrelevante, mas correspondentes ao Ac de interesse – IgG2a-HLA-B27-FITC / IgG1-HLA-B7-PE – pois partilham algumas características estruturais com estes. ⁽⁵⁰⁾

3.1.2 PCR – GenoQuick

A técnica de PCR (reação de polimerização em cadeia) foi descrita em 1985 pela primeira vez, por Kary Mullis. Esta baseia-se na amplificação exponencial seletiva de uma pequena porção de cópias de DNA ⁽¹⁰⁾ possibilita replicações *in vitro*, num curto intervalo de tempo, de quantidades mínimas de material genético, que podem ser



amplificados milhões de vezes. Atualmente esta técnica é a base da biotecnologia molecular, uma vez que conduziu significativamente a avanços científicos em todas as áreas de investigação genómicas, designadamente diagnóstico molecular, medicina forense, entre muitas outras. ⁽⁹⁾

Na reação de PCR são aplicadas temperaturas elevadas de maneira a que as moléculas de cadeia dupla de DNA sofram desnaturação, resultando duas cadeias nucleotídicas simples. O objetivo do método é replicar um fragmento de interesse, logo é necessário a utilização de sequências sintéticas de nucleótidos iniciadores (*primers*), geralmente constituídos por 15 a 30 nucleótidos. A mistura de reação inclui dois *primers* (sequências oligonucleotídeas) que marcam as extremidades das cadeias simples produzidas no passo anterior, que hibridizam (*annealing*) com a sequência complementar a uma temperatura de 40° a 65°C. Na fase de extensão, a temperatura eleva-se para aproximadamente 72 °C e a enzima Taq polimerase, uma polimerase de DNA termo-estável recombinante da bactéria termófila, *Thermus aquaticus*, replica a cadeia de DNA. ⁽¹⁰⁾ A extensão inicia-se sempre no extremo 3' do *primer*, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples. A Taq polimerase sintetiza exclusivamente na direção 5' para 3'. ⁽⁹⁾

O teste de HLA B-27 GenoQuick possibilita a deteção molecular rápida do gene humano HLA B-27. Utilizando uma sequência de primers específica, no caso da presença do gene HLA-B27, formam-se fragmentos amplificados. Posteriormente, com o auxílio de tiras próprias, estes são detetados. ⁽⁵²⁾

O teste de HLA B-27 GenoQuick aplica a técnica de PCR e possibilita a deteção molecular rápida do gene humano HLA B-27. Utilizando *primers* de sequência específica, ocorre amplificação apenas na presença do gene HLA-B27 no DNA molde. A deteção dos produtos de amplificação é feita de forma simples em tiras fornecidas com o kit. Os fragmentos amplificados de cadeia simples hibridizam com uma sonda específica incluída na mistura de primers de nucleotídeos (PNM). Este complexo, liga-se, então seletivamente à banda teste. Todo o procedimento pode ser dividido em três etapas, esquematizadas na figura seguinte (Figura 12): ⁽⁹⁾



Figura 12: Representação do procedimento da PCR GenoQuick. ⁽⁵³⁾



3.1.2.1 Extração de DNA

A partir de sangue venoso, colhido em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) o DNA é extraído com a ajuda do GENO-CARD, para utilizar nos kits da Hain Lifescience (Figura 13).^{(52) (54)}



Figura 13: Cartão de extração de DNA – GENO-CARD – caneta perfuradora.⁽⁵⁴⁾

Segundo a bula do produto, o GENO-CARD permite a extração e o armazenamento de ácidos nucleicos amplificáveis durante pelo menos três meses desde que mantido em local seco e protegido da luz. Cada GENO-CARD comporta quatro amostras teste. Com a ajuda de uma caneta perfuradora que contém bases de corte, recolhe-se um disco de amostra que pode ser utilizada diretamente numa reação de amplificação.^{(52) (54)}

3.1.2.2 Mistura de Amplificação

A avaliação do desempenho do GenoQuick HLA-B27 é realizada usando a enzima HotStar-Taq DNA polimerase da Qiagen. A mistura de reação contém:⁽⁵²⁾

- 35 µl PNM;
- 5 µl Tampão de PCR (contém 15 mM MgCl₂);
- 2 µl 25 mM MgCl₂;
- 0.2 µl (1U) HotStarTaq;
- 3 µl Água destilada ultra pura.

O tampão de PCR (QIAGEN), facilita a amplificação específica de produtos. Durante a etapa de reconhecimento de cada ciclo de PCR, o tampão permite uma alta taxa de ligação específica, devido a uma peculiar combinação equilibrada de KCl e (NH₄)₂SO₄, fornecendo, então rigorosas condições de primer-annealing em uma ampla gama de temperaturas.⁽⁵²⁾

A Taq DNA polimerase é uma enzima recombinante de alta qualidade produzida pela QIAGEN. Esta enzima é adequada para aplicações padrão especializadas, tais como PCR “differential display” e PCR baseada em “impressões digitais” de DNA



(obtida a partir de uma ínfima amostra). No “hot-start” PCR, a actividade da polimerase só se inicializa após a etapa de desnaturação inicial. Nos casos em que é necessário uma maior especificidade, a HotStarTaq Polimerase DNA oferece um método mais confiável e conveniente para a PCR. (55)

A enzima é fornecida no estado inativo, não exibindo nenhuma atividade, evitando a extensão de primers inespecíficos, a baixas temperaturas durante a configuração de reação no período de aquecimento inicial. A etapa de ativação dá-se a uma temperatura alta, assim também desnatura primers inespecíficos e garante amplificação de primers altamente específicos. (52) (55)

3.1.2.3. Protocolos de PCR

As amplificações foram realizadas num termociclador Bioer – Little Genius que tem pré configurados os ciclos de PCR para a aplicação correspondente a este trabalho (Figura 14).

	extracted DNA	GENO•CARD
15 min 95°C	1 cycle	1 cycle
30 sec 95°C 2 min 58°C	10 cycles	10 cycles
25 sec 95°C 40 sec 53°C 40 sec 70°C	20 cycles	25 cycles
8 min 70°C	1 cycle	1 cycle
2 min 95°C	1 cycle	1 cycle
5 min 20°C	1 cycle	1 cycle

Apesar de terem limites de estabilidade, os produtos de amplificação podem ser armazenados a uma temperatura entre +8 a -20°C. (52)

Em cada corrida de PCR é incluído um controlo negativo, que pode ser um disco branco, amostra de água ou tubo de PCR apenas com “mix” e um controlo positivo, que pode ser um disco de uma amostra positiva ou Positive Control HCD GQ HLA-B27, incluído no kit. (52)

Figura 14: Representação dos ciclos de PCR.

3.1.2.4 Análise dos Produtos de Amplificação

Finalizada a reação de PCR, a amostra amplificada é transferida para um tubo próprio que já deve conter o tampão de corrida (RB – Running Buffer). De seguida introduz-se as tiras

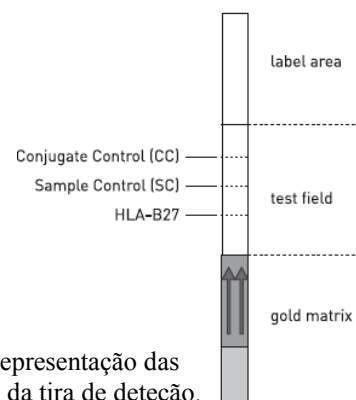


Figura 15: Representação das diferentes áreas da tira de detecção. (52)



de identificação (Figura 15), nos respectivos tubos, tendo o cuidado de manusear apenas na área de marcação (*label area*)” e manter a orientação correta, destas.⁽⁵²⁾

Os resultados são lidos (interpretados), após 10 minutos de incubação.⁽⁵²⁾

3.1.2.5 Interpretação de Resultados

Esta metodologia permite detectar os alelos HLA-B*27 do 02 até ao 17, do 19 até ao 21, e ainda os alelos 24, 25, 27, 28, 30 e do 32 até ao 36. Este teste não permite detectar os alelos HLA-B*27 01, 18, 23, 26, 29 e 31.⁽⁵²⁾

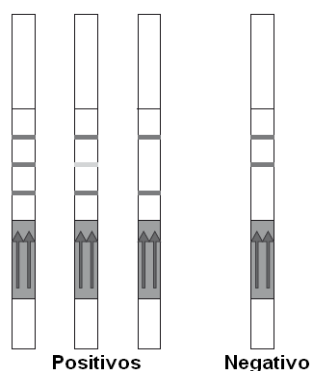


Figura 16: Padrões válidos de bandas.⁽⁵²⁾

A validação do resultado corresponde ao desenvolvimento de uma banda na área do controlo de conjugado (CC) o que confirma a eficiência de ligação do conjugado e o fluxo adequado da amostra ao longo da tira de detecção (Figura 16). Quando o teste é efetuado corretamente, o produto de amplificação liga-se na área reservada ao controlo de amostra (SC). O aparecimento desta banda, para além, de confirmar a presença de DNA, também indica que a reação de amplificação ocorreu de forma correta.⁽⁵²⁾

São ainda considerados positivos os caso que o sinal da banda na zona SC esteja ténue. Se o resultado for negativo, esta banda fraca ou ausente, indicadora de erros de na replicação ou ainda a uma inibição por sobrecarga do sistema de teste (competição de produtos). Neste caso o teste não é válido e deverá ser repetido (Figura 17).

Na área correspondente ao HLA-B27, desenvolvem-se as bandas em amostras que tenham o gene da classe I presente (Figura 15). A intensidade da banda deve ser equivalente à da banda SC respetiva, pois um sinal fraco pode significar a presença de um gene HLA-B similar apenas com pequenas diferenças estruturais ou por um alelo HLA-B27, não coberto pelos primers específicos e sondas incluídos neste kit (GenoQuick – HLA-B27).

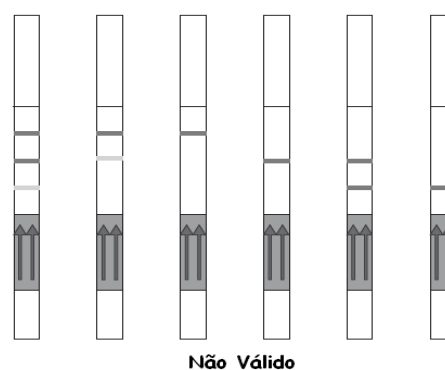


Figura 17: Padrões não válidos de bandas.⁽⁵²⁾



Assim, o teste não pode ser considerado válido e devem aplicar-se métodos adicionais para identificar o alelo presente.⁽⁵²⁾

3.2 Procedimentos

3.2.1 População e Amostra

Como população para este estudo foram considerados os utentes que requerem a análise para a deteção do Ag HLA-B27, no Laboratório de Patologia Clínica Hilário de Lima – Braga (LHL). Este laboratório serve todo o distrito de Braga.

O estudo foi realizado sobre um universo de amostragem constituído por 56 utentes, numa população de 141 que requereram a análise para a deteção do Ag HLA-B27 no LHL, no período de 14 de Julho a 17 de Setembro de 2011. Por dia (excetuando os domingos e feriados), escolheu-se uma amostra de forma aleatória

De salientar que não foram utilizadas todas as amostras disponíveis (registadas no laboratório) durante este período de tempo, uma vez que o número de análises foi limitado pelo número de kits oferecidos pela empresa Iberlab & Imunoreage.

3.2.2 Colheita das amostras

As amostras biológicas a utilizar foram colhidas por técnicos de saúde do LHL nos diversos postos de colheitas do distrito de Braga pela técnica de punção venosa, e transferidos para tubos com anticoagulante EDTA/K3 (tubos da Vacuette de 3mL). O processamento das amostras de sangue total para deteção do Ag HLA-B27 é efetuado diariamente e inicia-se com o pré tratamento destas (ver ponto 3.4.1.1), para posterior análise por Citometria de Fluxo (CF).

A restante amostra é refrigerada a 5°C, para a realização da análise por PCR (ver ponto 3.1.2.1), pelo método da GenoQuick (HAIN-LIFESCIENCE). Esta efetuou-se apenas quando se reuniu um número de amostras igual ou superior a dez.

3.2.3 Citometria de Fluxo

3.2.3.1 Pré-tratamento da amostra

O tratamento da amostra inicia-se com a adição a cada tubo de 20µL de Ac monoclonais conjugados IOTest da Beckman Coulter. Ao controlo negativo é adicionado IgG1-PE / IgG2-FITC e ao tubo com a amostra adiciona-se HLA-B27-FITC / HLA-B7-PE. Em seguida, adiciona-se 100 µL de amostra a analisar a ambos os tubos



e agita-se suavemente no vórtex. Os tubos são incubados 15-20 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz.^{(49) (50)} Por fim, procede-se à lise dos glóbulos vermelhos, com a ajuda do equipamento Coulter Q-Prep Epics e reagentes IMMUNOPREP⁽⁵¹⁾ (Beckman Coulter). A ordem de adição dos reagentes é a seguinte.

- Reagente A (ácido fórmico) – lisante de eritrócitos;
- Reagente B (carboneto/ cloreto/ sulfato de sódio) – estabilizador de leucócitos;
- Reagente C (tampão paraformaldeído) – fixador da membrana.⁽⁵¹⁾

Entre cada reagente o preparador automático, agita o conteúdo do tubo, segundo um procedimento pré-programável.⁽⁵¹⁾ Por fim a amostra está pronta a ser testada pelo Citómetro de Fluxo – Couter Epics XL da Beckman Coulter.

3.2.4 PCR-GenoQuick

3.2.4.1 GENO-CARD

Para a análise por PCR, é necessário verificar se a zona de trabalho está livre de DNA e identificar a amostra no campo de texto do GENO-CARD (Hain-Lifescience). Uma alíquota de 15 µL de sangue total (colhido em EDTA) é pipetada para o centro do campo das amostras. O GENO-CARD é incubado aberto durante 15 minutos a 37-40°C. No final da incubação recorta-se um disco de amostra com a caneta perfuradora e transfere-se para o tubo de PCR contendo a mistura de amplificação. A caneta de perfuração deve ser descontaminada entre amostras diferentes, retirando pelo menos três discos do campo isento de amostras.⁽⁵⁴⁾

3.2.4.2 Mistura de Amplificação

A preparação da mistura de amplificação é feita numa zona de trabalho exclusiva, ou seja, separada da preparação de amostras e da recolha de discos. A estimativa do volume de cada um dos constituintes é feita mediante consulta de uma tabela (Tabela 4) fornecida pelo fabricante, tendo em conta o número de amostras a analisar e os controlos. Após a mistura de todos os reagentes, transfere-se 45 µL da



mistura de amplificação para os tubos de PCR e adiciona-se um disco de amostra, tendo o cuidado de verificar se este está completamente imerso na mistura de amplificação e não aderente às paredes do tubo. ⁽⁵²⁾

Tabela 4: Tabela da preparação da “mix” de PCR – GenoQuick HLA-B27. ⁽⁵²⁾

	Volume de Reagentes (μL)				
Nº de Determinações	PNM	Tampão 10× (com MgCl ₂)	MgCl ₂	H ₂ O	TAQ
1	35	5	2	3	0.2
2	70	10	4	6	0.4
3	105	15	6	9	0.6
4	140	20	8	12	0.8
5	175	25	10	15	1.0
6	210	30	12	18	1.2
7	245	35	14	21	1.4
8	280	40	16	24	1.6
9	315	45	18	27	1.8
10	350	50	20	30	2.0

3.2.4.3 Hibridação GenoQuick HLA-B27

Após o final do ciclo de PCR mistura-se 100 μL de Tampão de Corrida (RB) e seguidamente adiciona-se 10 μL da amostra amplificada a um tubo previamente identificado, homogeneizando suavemente com a ajuda da micropipeta. Em cada um dos tubos aplica-se uma tira de deteção e incuba-se à temperatura ambiente durante 10 minutos antes de se proceder à leitura e registo dos resultados. ⁽⁵²⁾



IV – Resultados e Discussão

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5. Foi analisado pelos dois métodos um total de 56 amostras. Destas, produziram resultado positivo por CF 15 amostras (37%) e por PCR da GenoQuick (GQ), 28 amostras (50 %).

Tabela 5: Representação dos resultados obtidos por ambas as técnicas utilizadas.

	Metodologia	
	<i>Citometria de Fluxo</i>	<i>GenoQuick HLA-B27</i>
Nº de resultados positivos	15	28
Nº de resultados negativos	41	28
TOTAL	56	56

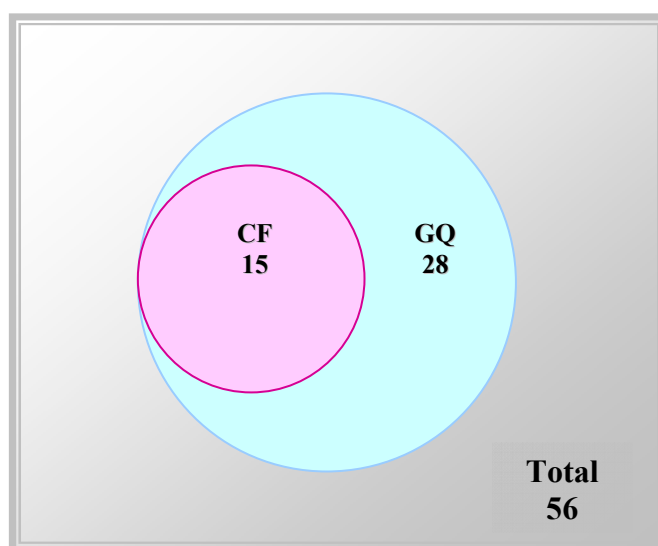


Figura 18: Representação do número de resultados positivos obtido com cada uma das técnicas no total de amostras analisadas pelos dois métodos.

CF – Citometria de fluxo; GQ – GenoQuick HLA-B27.

O número de resultados obtidos foi bastante diferente para cada uma das técnicas. Todas as amostras que produziram resultado positivo (Figura 18) por CF, corresponderam também a resultado positivo pela PCR da GQ. No entanto, 13 amostras consideradas como negativas, quando analisadas pela CF, produziram resultado positivo na análise de PCR. O número de resultados positivos obtido por PCR foi aproximadamente o dobro do número de resultados positivos obtidos por CF.



Uma vez que a análise de CF se mostrou menos sensível na deteção de alterações no gene HLA-B27 do que a reação de PCR, e considerando que alguns utentes realizam a deteção do Ag HLA-B27, mais que uma vez tornou-se pertinente avaliar se algumas das amostras positivas correspondiam a doentes já sujeitos a análises anteriores. Dos treze resultados positivos obtidos por PCR, cinco correspondiam a utentes em que a análise tinha já sido feita anteriormente e com resultado negativo. Esta situação pode ser interpretada como indicação de que a análise por PCR permite uma deteção mais precoce do que a análise por CF que depende não só da existência do alelo mas também da sua expressão. Quando se recorre à CF realiza-se uma avaliação do fenótipo, ou seja, do produto proteico expresso na superfície celular. Assim, sendo, mediante o padrão de expressão génica, verifica-se uma diferença na quantidade de complexo Ag-Ac formado e consequentemente também uma diferença na intensidade de fluorescência. A análise por PCR permite detetar diferentes formas alélicas, independentemente do seu grau de expressão, ou seja, constitui uma ferramenta de análise genotípica.

Num indivíduo com uma combinação de alelos HLA-B27 que resulte num fenótipo de fraca expressão proteica deste Ag, ao realizar-se a deteção do Ag por PCR, o resultado será positivo, pois esta metodologia deteta os alelos presentes independentemente da sua expressão. No entanto, a CF poderá produzir resultado negativo, uma vez que a quantidade de proteína expressa pode não ser suficiente para formação de uma quantidade detetável do complexo Ag-Ac. Neste contexto, seria interessante conhecer a história clínica e familiar dos utentes cujas análises iniciais eram negativas mas que neste estudo produziram resultados positivos e verificar a existência ou não de sintomatologia de doença e a análise dos vários testes de diagnósticos já realizados.

O kit de PCR GenoQuick tem como principal limitação o facto de, detetar apenas alguns alelos do gene. No entanto, os que não são detetáveis por este método são extremamente raros. A apresentação em kit tem como grande vantagem a simplicidade de execução da análise. Com o GENO-CARD a extração de DNA é muitíssimo simplificada e a deteção é muito prática, o que torna o procedimento claramente mais rápido do que outros métodos similares. Os custos da análise por PCR ou por CF, não são significativamente diferentes. A obrigatoriedade de reservar espaços exclusivamente para certos procedimentos pode, no entanto, constituir um obstáculo à implementação de técnicas de biologia molecular em laboratórios vocacionados para as análises de rotina.



V – Conclusão

Com este trabalho pretendia efetuar-se uma comparação de dois métodos baseados em técnicas diferentes (CF e PCR) no estudo de Ag HLA-B27. Os resultados obtidos permitem concluir que a deteção pelo método baseado em PCR correspondente ao kit GenoQuik permitiu a obtenção de um maior número de resultados positivos do que a deteção do Ag HLA-B27 por CF, uma vez que a primeira abordagem deteta sequências no DNA correspondentes a várias formas alélicas enquanto que o segundo deteta Ag expressos pelas células.

Embora tendo custos equivalentes, o elevado grau de automação da análise e leitura dos resultados justifica que a análise por CF seja ainda o método de eleição na rotina clínica de muitos laboratórios, tal como o LHL. Para esta situação contribui a maior exigência das técnicas baseadas em PCR quanto a espaços reservados.

No entanto, os resultados obtidos apontam para uma maior sensibilidade da análise por PCR e constituem um argumento importante relativamente à utilidade clínica da informação obtida por técnicas de biologia molecular. Assim sendo, os portadores de alelos cujo fenótipo seja mais fracamente expresso na evolução clínica da patologia deveriam ser alvo de acompanhamento. Do ponto de vista clínico, quanto mais cedo se fizer a deteção do Ag HLA-B27, maior a probabilidade de se chegar a um diagnóstico precoce e à intervenção com terapia adequada no sentido da estabilização de manifestações clínicas, contribuindo para um melhor prognóstico da doença e consequentemente melhor qualidade de vida do doente.

A PCR por si só é uma técnica revolucionária, que como bem se sabe, abriu uma série de horizontes a nível de investigação. Com procedimentos de fácil execução, bem como, de custos idênticos à CF parece agora expandir-se para novos mercados. Com a PCR GenoQuick, a maioria dos casos que suscitam dúvida pela CF, desaparecem, pois consegue-se obter resultados mais fidedignos, com tudo isto, caso se opte por mudar de metodologia, não será difícil de a introduzir na rotina laboratorial deste laboratório.



VI – Bibliografia

1. Nobel Media AB Web (2010). Nobel Prize. Acedido em 05/05/2011.
2. Dausset J., (1998). O Selo da Individualidade; Tradução de Jorge Pinheiro (2000), Instituto Piaget.
3. Magalhães P., Böhlke M., Neubarth F., (2004). Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC): codificação genética, bases estruturais e implicações clínicas; Rev. Med. UCPEL, Pelotas, 2 (1), Jan-Jun: 54-59.
4. Roitt I., Brostoff J., Male D., (1999). Imunologia, 5ª Edição, Editora Manole LTDA.
5. Silva M., Mory D., Davini E., (2008). Marcadores Genéticos e Auto-imunes do Diabetes Mellito tipo I: da Teoria para a Prática. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia 2008;52/2 [Versão eletrônica].
6. Marin M., (2007). Temas de Reumatologia Clínica; Vol. 8, nº2, Jun: 40-43.
7. Donaldi E., (2000). Como Entender a Nomenclatura e os Mecanismos de Associação entre os Antígenos e os alelos de Histocompatibilidade com as Doenças. Simpósio Faculdade de Medicina – Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Jan./Mar. 7-18.
8. Europe Bioinformatics Institute (2011). IMGT – HLA Nomenclature.
9. Vieira A. (2001). Engenharia Genética, Princípios e Aplicações, 2ª Edição, LIDEL.
10. Regateiro F.(2003). Manual de Genética Médica, Imprensa da Universidade de Coimbra.
11. Centro de Histocompatibilidade do Norte (2008). Antígeno HLA e Doença.
12. Sampaio-Barros D., Carvalho P., Azevedo F., Campos R., Carneiro S., Giorgi N., Gonçalves R., Hilário E., Keisernlan W., Leite H., Pereira A., Vieira P., Vilela G., Xavier M., Ximenes C., (2004); Espondiloartropatias, Revista Brasileira de Reumatologia.
13. Branco J., (2006), Grandes Síndromes em Reumatologia, Lidel, 32-37/ 219.



14. Peixoto M., Gonzales T., Spínola R., Couto M., Gantes A., Brehm R., Santos F., Garrett J., Bruges A., (2005), Polimorfismo do Alelo HLA-B27 no desenvolvimento das Espondiloartropatias. *Acta Médica Português*, 18: 283-294.
15. Pradeep J., Keat A., Gaffney K., (2008) Predicting outcome in Ankylosing Spondylitis. *Rheumatology – Oxford Journals*, 47: 942-945.
16. Lucas R., Monjardino M., (2010), O Estado da Reumatologia em Portugal – Programa Nacional Contra as Doenças Reumáticas.
17. Pimentel dos Santos F., Bastos E., Ligeiro D., Mourão F., Chaves R., Trindade H., Guedes-Pinto H., Branco J., (2007); Espondilite Anquilosante e a sua Base Genética. *Acta Reumatológica Portuguesa*; 32: 243-252.
18. Cravo A., Tavares V., Silva J., (2006), Terapêutica Anti-TNF ALFA na Espondilite Anquilosante. Serviço de Reumatologia Hospital Garcia de Orta- Almada; *Acta Médica Portuguesa*, 19: 141-150.
19. Braun, J. (2002); Building Consensus on Nomenclature and Disease Classification for Ankylosing Spondylitis: results and discussion of a questionnaire prepared for the International Workshop on New Treatment Strategies in Ankylosing Spondylitis, Berlin , Germany,2002. *Ann Rheum Dis* 61:61 -7.
20. Sims M., Wordsworth P., Brown A., (2004); Genetic Susceptibility to Ankylosing Spondylitis. *Current Molecular Medicine*; 4: 13-20.
21. MSD Portugal (2009), Manual de Merck – Perturbações dos ossos e músculos; Capítulo 51.
22. Mathieu A., Cauli A., Fiorillo T., Sorrentino R, (2009) HLA-B27 and Ankylosing Spondylitis Geographic Distribution Versus Malaria Endemic: Casual or Casual Liaison? *Ann Rheum Dis*, 49: 138-140.
23. Goodall C., Ellis L., Gaston H., (2006) Spondylarthritis-Associated and Non- Spondylarthritis-Associated B27 subtypes differ in their dependence upon tapasin for surface expression and their incorporation into the peptide loading complex. *Arthritis & Rheumatism*; 49: 138-147.
24. Carter W., Pluzhnikov A., Timms A., Miceli-Richard C., Bourgain C., Wordsworth B., Jean-Pierre H., Cox N., Palmer L., Breban M., Reveille J., Brown M., (2006); Combined Analysis of Three Whole Genome Linkage Scans for Ankylosing Spondylitis. *Oxford Journals*; 46: 763-771.



25. Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 883-886.
26. Taurog D., Maika D., Simmons A., Breban M., Hammer E., (1993); Susceptibility to Inflammatory Disease in HLA-B27 Transgenic Rat Lines Correlates with the Level of B27 Expression. *Journal Immunology*; 150: 4168-4178.
27. Cauli A, Dessole G, Fiorillo MT (2002); Increased level of HLA-B27 Expression in Ankylosing Spondylitis Patients Compared with Healthy HLA-B27-positive Subjects: a possible further susceptibility factor for the development of disease. *Rheumatology*; 41:1375-1379.
28. Allen L., O'Callaghan A., McMichael J., Bowness P., (1999); Cutting Edge: HLA-B27 Can Form a Novel β 2-Microglobulin-Free Heavy Chain Homodimer Structure. *Journal Immunology*; 162: 5045-5048.
29. Barcelos f. (2009/2010); Artrite Psoriática. Instituto Português de Reumatologia.
30. Mear P., Schreiber L., et al. (1999); Misfolding of HLA-B27 as a Result of its B Pocket Suggests a Novel Mechanism for its Role in Susceptibility to Spondyloarthropathies. *Journal Immunology*; 163: 6665-6670.
31. Cox, J., (2002), Dor Lombar, 6ª Edição, Editora Manole LTDA.
32. Santos H. (2009/2010); Espondilite Anquilosante. Português de Reumatologia.
33. Silva F., Portelinha D. (2006); Espondilite Anquilosante. Núcleo de Estudos de Doenças Auto-Imunes (NEDAI) Sociedade Portuguesa de Medicina Interna (SPMI).
34. Linssen A, Meenken C. (2005); Outcomes of HLA-B27-positive and HLA-B27 negative acute anterior uveitis. *Am J Ophthalmol*; 120:351-61.
35. Freitas A. (2011); Caracterização Fenotípica e Genotípica de Doentes Açorianos com Espondilite Anquilosante, Universidade dos Açores. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas).
36. Seipp M., Erali M., Wies R., Wittwer C., (2004); HLA-B27 Typing: Evaluation of an Allele-Specific PCR Melting Assay and Two Flow Cytometric Antigen Assays; Wiley-Liss, Inc.
37. Mendonça, L., Ferreira, M. (2011); Associação do HLA com o Transplante Alogênico de Células-Tronco hematopoiéticas; *Revista Pós Newton Paiva*, nº 3.



38. Rejane A., Jorge E., et al (2003), Espondilite Anquilosante, *Imunogenético e Radiológicos Rev Bras Reumatol*, v. 43, n. 5, p. 287-93.
39. Bowness P.(2000); HLA-B27 in Health and Disease: a double-edged sword? *British Society for Rheumatology*, 2002: 41:857-868 (Oxford Journals).
40. Sheehan N. (2009); HLA-B27: what's new? *Oxford Journals*, 41: 621-631 (British Society for Rheumatology).
41. Hülsmeier M., et al (2004) Dual HLA-B27 Subtype-dependent Conformation of a Self-peptide; Rockefeller University Press, (*Journal Experimental Medicine*) Number 2: 271–281.
42. Behring (1992); Histognost-B7: HLA-B27 Test Plate for the Cytotoxicity Test according to Terasaki and NIH (Bula).
43. Coulter Corporation (1998); COULTER EPICS XL-MCL™ Flow Cytometer (Manual) PN 42372988 - Dezembro 1998.
44. Santos P.(2008); *Citometria de Fluxo: Aplicações práticas*; Universidade Católica de Salvador. Dissertação (Mestrado em Imunologia), SlideShare (2011).
45. *Assessores médicos em Hematologia e Hemostasia* (2007); *Imunofenotipagem das neoplasias hematológicas*. Fleury: Medicina e Saúde (2011).
46. Horewicz V., Menezes N.(2010). *Curso de férias em Imunologia e Biologia Molecular: Métodos e Aplicações*. Universidade Federal de Santa Catarina.
47. Invitrogen (2011). *Introduction to Flow Cytometry*; Life technologies.
48. Invitrogen (2011). *Data Analysis for Flow Cytometry*; Life technologies.
49. IOTest, Beckman Coulter (2007). (Bula); *Conjugated Antibodies, HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE*.
50. IOTest, Beckman Coulter (2007). (Bula); *Analyze Specific Reagent, IgG2a (MOUSE)-FITC/IgG1 (MOUSE)-PE*.
51. Beckman Coulter (2007). (Bula); *IMMUNOPREP Reagent System*.
52. *GenoQuick HLA-B27* (2010). (Bula); *Rapid Molecular Genetic Assay for Detection of the HLA-B*27 Gene*.



- 53. Hain Lifescience (2011). GenoQuick- HLA-B27.
- 54. Hain Lifescience (2011). Geno CARD.
- 55. Quiagen; Taq PCR Handbook (2010).

ANEXOS

ANEXO A – Bula do Geno CARD – Hain Lifescience

GENO•CARD

O **GENO•CARD** permite a preparação e o armazenamento de ácidos nucleicos amplificáveis para usar nos kits da Hain Lifescience. Com a ajuda do perfurador e das bases de perfuração especiais (ver capítulo Informações Para Encomenda), os discos podem ser removidos e directamente usados numa reacção de amplificação. Os Kits compatíveis têm uma nota no manual.

Armazenamento e Precauções

Armazene o **GENO•CARD** num local seco, protegido da luz e a temperatura ambiente. As amostras preparadas podem ser armazenadas durante, pelo menos 3 meses.

Os espécimes de pacientes e as culturas feitas a partir de espécimes de pacientes devem ser sempre considerados como potencialmente infecciosos. As amostras de pacientes de risco e as culturas feitas a partir dessas amostras devem ser sempre rotuladas e manuseadas sob condições adequadas de segurança. Observe todos os regulamentos ambientais e de segurança federais, estaduais e locais. Use sempre luvas e roupa protectora apropriada. O tratamento dos espécimes e a preparação das amostras até, inclusive, a adição dos discos ao tubo de PCR deve ser realizada numa câmara de segurança classe II. Alternativamente, as amostras podem ser inactivadas a 100°C por, pelo menos 1 hora.

Observe as precauções habituais para preparar a amplificação. É essencial que todos os reagentes e todos os materiais usados para a extracção de ADN e para a preparação da amplificação estejam livres de DNases.

Para evitar contaminações devem ser realizadas regularmente as seguintes medidas de limpeza:

Para limpar o perfurador, retire a ponta, lave com 1,5% de solução de hipoclorito de sódio e a seguir passe por água desmineralizada. Execute o mesmo procedimento com o êmbolo. Seque com ar comprimido ou enxaguando com etanol a 99,8%. Limpe a superfície exterior do perfurador com etanol a 70%. Depois de usar, remova a base de perfuração do **GENO•CARD**, limpe bem com 1,5% solução de hipoclorito de sódio, passe por água desmineralizada e deixe secar ao ar.

Preparação de DNA e Amplificação

De seguida, um protocolo geral de amplificação de amostras de sangue a partir do **GENO•CARD** é descrito. Ele aplica-se aos kits da Hain Lifescience. Para mais informação leia, por favor, o manual respectivo.

O protocolo para processamento de amostras de cultura de sangue é descrito nos manuais respectivos.

A vantagem de usar o **GENO•CARD** para a preparação de ADN é um tempo de manipulação curto e simples. Como o ADN, estritamente falando, não é isolado por este método e concentrações baixas de ADN são aplicadas para a PCR, pode ocorrer raramente o aparecimento de sinais fracos que não possam ser avaliados. Neste caso o teste deveria ser repetido usando a amostra respectiva isolada por um método convencional.

Preparação das amostras de sangue

Com cada **GENO•CARD** podem ser preparadas um total de 4 amostras. Realize a preparação das amostras numa área livre de DNA amplificável.

1. Pipete, lentamente e com cuidado, cerca de 15 µl ou uma gota de amostra de sangue para o centro do campo das amostras do **GENO•CARD** e identifique a amostra no campo de texto respectivo.
2. Seque o **GENO•CARD**, com a tampa aberta, numa estufa de secagem, durante 15 min a 37–40°C. As amostras preparadas podem ser armazenadas a temperatura ambiente num local seco e protegido da luz durante, pelo menos 3 meses.

Mistura de amplificação

Prepare a mistura de amplificação (45 µl) numa sala livre de DNA, separada da área de preparação das amostras e da recolha dos discos. É recomendado o uso da mesma polimerase usada na avaliações do desempenho do sistema de teste (ver capítulo Limitações no manual do kit).

Mistura por tubo:

- 35 µl de PNM
- 5 µl de tampão de PCR 10x – não fornecido
- x µl de solução de $MgCl_2$ ¹⁾ – não fornecida
- 1-2 unidades de ADN polimerase termoestável (consultar o manual) – não fornecida
- y µl de água („molecular biology grade“) para obter um volume de 45 µl (não considerando o volume de enzima) – não fornecida

¹⁾ Dependendo do sistema enzima/tampão usado, a concentração óptima de $MgCl_2$ pode variar entre 1,5 e 2,5 mM. Note, por favor, que alguns tampões de incubação já possuem $MgCl_2$.

Determine o número de amostras a amplificar (número de amostras a analisar mais amostras de controlo, ver abaixo). Prepare a „master mix“ contendo todos os reagentes, excepto os discos, misture bem (não use o vortex). Faça alíquotas de 45 µl para tubos de PCR.

Controlos: Uma amostra de controlo de contaminação contém um disco do campo de descontaminação oval; uma amostra de controlo positivo contém 5µl da solução DNA Control [HCD], fornecida com o kit. O genótipo do HCD é indicado no manual respectivo.

Obtenção do disco

Realize a recolha dos discos do **GENO•CARD** numa área livre de DNA amplificado.

1. Insira a base de perfuração na abertura lateral do **GENO•CARD**. Remova a tampa protectora do perfurador.
2. Coloque o perfurador (ver capítulo Informações Para Encomenda) verticalmente na „mancha“ seca da amostra, rode o perfurador no sentido dos ponteiros do relógio, pressione fortemente a matriz de DNA do campo das amostras até o disco destacado se localizar dentro da ponta de corte. Enquanto pressiona o perfurador na matriz não pressione o êmbolo.
3. Pressionando o êmbolo transfira o disco para o tubo de PCR que contém 45 µl da mistura de amplificação.
4. Para descontaminar a ponta retire pelo menos 3 discos do campo oval localizado à direita do campo das amostras; descarte o disco todas as vezes.

Nota: Observe os procedimentos de limpeza descritos no capítulo de armazenamento e precauções. Se forem visíveis sinais claros de uso na base de perfuração, esta deve ser substituída. Note, por favor que cada base possui quatro áreas para perfurar. Se a ponta de perfuração ficou cega, pode ser encomendada uma ponta de substituição à Hain Lifescience (ver capítulo Informações Para Encomenda).

Amplificação

Verifique a presença do disco em cada tubo de PCR; no caso de se encontrar colado à parede, agite ou centrifugue para ele ficar na mistura de amplificação.

O perfil de amplificação e as informações sobre os produtos de amplificação são dados no manual respectivo.

Limitações

A avaliação do desempenho do sistema de isolamento **GENO•CARD** DNA foi realizada unicamente com os kits compatíveis da Hain Lifescience, aplicando as condições indicadas no manual respectivo. O utilizador está encarregue de validar a aplicabilidade do **GENO•CARD** para qualquer outro uso específico pretendido.

ANEXO B – Bula do GenoQuick- HLA-B27 Hain Lifescience

GenoQuick® HLA-B27 Rapid Molecular Genetic Assay for Detection of the HLA-B*27 Gene



GENO•CARD-compatible

Methodology

The **GenoQuick® HLA-B27** test permits the fast molecular genetic detection of the human HLA-B*27 gene. First, in case of the presence of the HLA-B*27 gene, an amplicon is generated using sequence specific primers. The amplicon is subsequently detected on a dipstick. For this purpose, the single stranded amplicon hybridizes with a specific probe included in the Primer Nucleotide Mix. This complex then selectively binds to the test band on the dipstick and is visualized by a gold labeling. The whole procedure is divided into three steps: (i) DNA extraction from a patient sample (blood; the necessary DNA extraction kit is not provided), (ii) multiplex amplification with differently labeled primers (the necessary thermostable DNA polymerase is not provided) with subsequent hybridization, and (iii) detection on the dipstick.

Storage and Precautions

Store Primer Nucleotide Mix and Positive Control DNA (HCD GQ HLA-B27) at 2-8°C upon arrival isolated from any potential source of contaminating DNA. If longer storage (more than 4 weeks) is required, store at -20°C. In order to avoid repeated freezing and thawing, aliquot PNM. Store all other kit components at 2-8°C. Close tube with dipsticks properly after each use; the inner tube wall is coated with desiccant. Do not use the reagents beyond their expiry date. Do not mix reagents from kits with different lot numbers.

Patient specimens must always be considered as potentially infectious. Samples from risk patients must always be labeled and handled under suitable safety conditions. No antibodies directed against HIV 1, HIV 2 and HCV, respectively, as well as no HBsAg are detectable in the raw material of the Control DNA; nevertheless the Control DNA solution should be considered as potentially infectious. The dipsticks contain components of animal origin and should therefore also be considered as

potentially infectious. Observe all federal, state, and local safety and environmental regulations. Always wear suitable protective clothing and gloves.

Observe the usual precautions for amplification set-up. It is essential that all reagents and materials used for DNA extraction and amplification set-up are free from DNases.

Quality Control

In order to validate the correct performance of the test and the proper functioning of kit components, each dipstick includes 2 control zones:

- a Conjugate Control zone to check the binding of the conjugate on the dipstick
- a Sample Control zone to check for a successful amplification reaction

A contamination control which should be included in each run contains water instead of DNA. Additionally, a positive control using the Positive Control DNA (HCD GQ HLA-B27) provided with the kit can be included.

DNA Extraction

DNA is extracted from EDTA/citrate blood. Heparin blood may only be used after an additional pre-treatment. A protocol for removal of inhibiting agents (e.g. heparin) from blood can be requested through: www.hain-lifescience.com

The working area must be free from amplified DNA. Any DNA extraction procedure producing amplifiable DNA from blood can be used. Validation of the assay was performed using the **GenoType DNA Isolation Kit** from Hain Lifescience, the QIAamp DNA Min kit from Qiagen and the **GENO•CARD** from Hain Lifescience. When using the **GENO•CARD**, see manual of the **GENO•CARD** for instructions.

Amplification

Prepare the amplification mix (45 µl) in a DNA-free room. The DNA sample should be added in a separated area. It is recommended to use a hot start DNA polymerase. If no such enzyme is used, all pipetting steps should be performed on ice with no delay.

Per tube mix:

- 35 µl PNM – provided
- 5 µl 10x polymerase incubation buffer – not provided
- x µl MgCl_2 solution¹⁾ – not provided
- 1-2 unit(s) thermostable DNA polymerase (refer to manual) – not provided
- y µl water to obtain a volume of 45 µl (not considering volume of enzyme) – not provided
- Add 5 µl DNA solution (20-100 ng DNA) leading to a final volume of 50 µl (not considering volume of enzyme).

¹⁾ Depending on the enzyme/buffer system used, the optimal MgCl_2 concentration may vary between 1.5 and 2.5 mM. Please note that some incubation buffers already contain MgCl_2 .

The performance evaluation of the **GenoQuick® HLA-B27** assay was carried out using the HotStarTaq DNA Polymerase from Qiagen. When using this enzyme, the followings amounts are required per sample:

- 35 µl PNM – provided
- 5 µl 10x PCR Buffer for HotStarTaq (contains 15 mM MgCl_2) – not provided
- 2 µl 25 mM MgCl_2 solution – not provided
- 0.2 µl (1 U) HotStarTaq – not provided
- 3 µl water (molecular biology grade) – not provided
- 5 µl DNA solution (add in a separated area)

The final MgCl_2 concentration in this amplification mix is 2.25 mM.

Determine the number of samples to be amplified (number of samples to be analyzed plus control samples). The positive control sample contains 5 µl of the Positive Control DNA solution (HCD GQ HLA-B27) provided. A contamination control contains 5 µl of water instead of DNA. Prepare a master mix containing all reagents except for DNA solution and mix well (do not vortex). Aliquot 45 µl in each of the prepared PCR tubes.

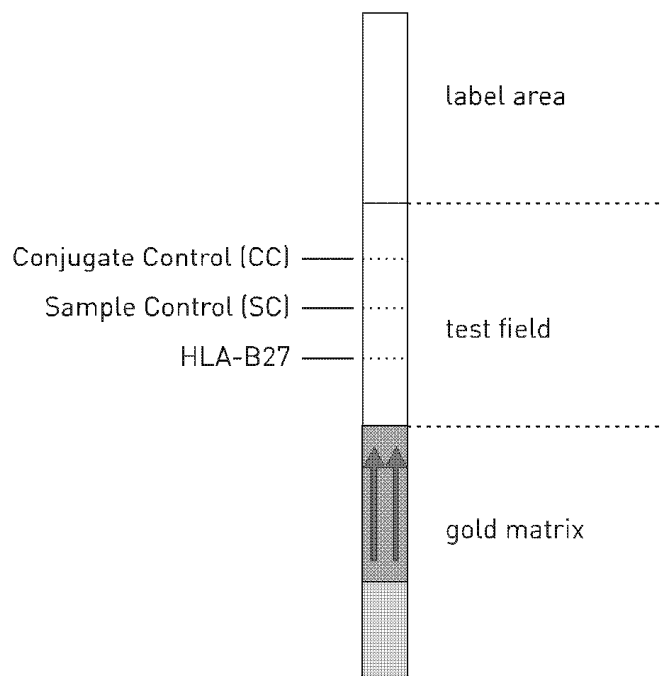
Amplification profile²⁾:

		extracted DNA	GENO•CARD
15 min	95°C	1 cycle	1 cycle
30 sec	95°C	10 cycles	10 cycles
2 min	58°C		
25 sec	95°C	20 cycles	25 cycles
40 sec	53°C		
40 sec	70°C		
8 min	70°C	1 cycle	1 cycle
2 min	95°C	1 cycle	1 cycle
5 min	20°C	1 cycle	1 cycle
(∞	8°C)		

²⁾ Applies to the Taq polymerase used for validation. When using other hot start DNA polymerases, the time interval of the first step might have to be reduced (please refer to manual of the enzyme).

Amplification products can be stored at +8 to –20°C. Please note, however, that the hybridization product has only a limited stability. Therefore, repeat the hybridization steps of the cycler program (2 min 95°C, 5 min 20°C) if the time interval between amplification and detection exceeds 30 min at room temperature (15-25°C) and 1 d at +8 to –20°C, respectively.

Detection



Preparation

Directly before starting the detection, remove one dipstick from the dipstick tube for each sample and mark them with a pencil in the white label area. The dipstick is almost completely covered with a transparent foil and can therefore be touched at the label area. For each sample, pipette 100 µl Running Buffer (RB) in a tube of the test rack provided.

1. **Add 10 µl hybridized amplicon to a tube filled with 100 µl RB and pipette up and down to mix well.**

The color of the RB will change to pale yellow after adding the amplicon.

2. **Place dipstick with the gold matrix facing downwards (arrows pointing upwards) in the respective tube and incubate for 10 minutes at room temperature.**

Positive results may be detected earlier; still, the indicated time should be observed. An extended incubation time, on the other hand, may lead to a change in signal intensity.

3. Remove dipsticks from tubes to read and note down results on the evaluation sheet provided (see chapter Evaluation and Interpretation of Results) and discard dipsticks.

Preserving dipsticks bears a contamination risk; additionally, the drying process may cause changes in signal intensities. Hence, the developed dipsticks should be discarded after documenting the result.

Dispose of dipsticks and tubes with remaining buffer in a container with freshly prepared 1.5% sodium hypochlorite solution and discard gloves. Treat working area with a freshly prepared 1.5% sodium hypochlorite solution and rinse with water.

Evaluation and Interpretation of Results

An evaluation sheet is provided with the kit.

Conjugate Control (CC)

A line must develop in this zone, documenting the efficiency of conjugate binding and proper flow of the dipstick.

Sample Control (SC)

When the test is performed correctly, a control amplicon will bind to the Sample Control zone on the dipstick. The Sample Control detects a conserved human gene locus and must always be developed. It thereby documents addition of DNA and the correct performance of the amplification reaction.

In case of a positive test result, the signal of the Sample Control zone can be weak. In this case, however, the amplification reaction was performed correctly and the test does not have to be repeated.

A weak or missing SC band in a negative test result indicates missing or degraded DNA, mistakes during amplification set-up, carry-over of amplification inhibitors, or inhibition due to overload of the test system (see chapter Troubleshooting). In this case, the test is not valid and the respective sample has to be repeated.

Please be aware that the Sample Control is not a PCR control, i.e. when implementing a contamination control (water instead of DNA solution in the PCR preparation) this reaction zone remains negative.

HLA-B*27

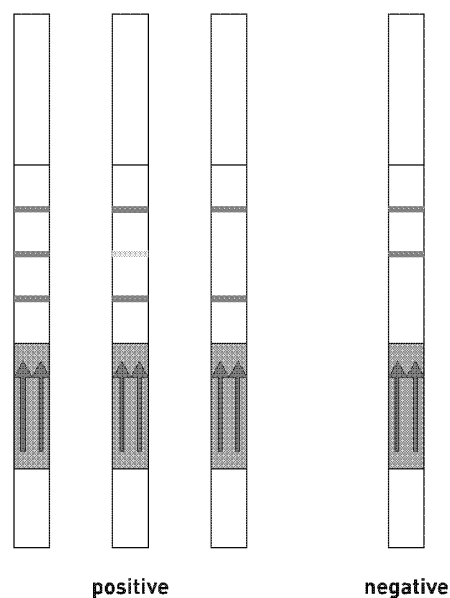
If this zone stains positive, the HLA-B*27 gene is present in the sample. The intensity of a positive signal must be as strong as or stronger than that of the respective Sample Control.

A weak signal at the HLA-B*27 band may be generated by a very similar HLA-B gene with only minor mismatches or by a HLA-B*27 allele which does not fully match the specific primers and probes used in this test kit. Hence, the test is not valid and additional methods have to be applied to identify the respective allele.

The following alleles are detected: HLA-B*27 allele 02 to 17, 19 to 21, 24, 25, 27, 28, 30, and 32 to 36.

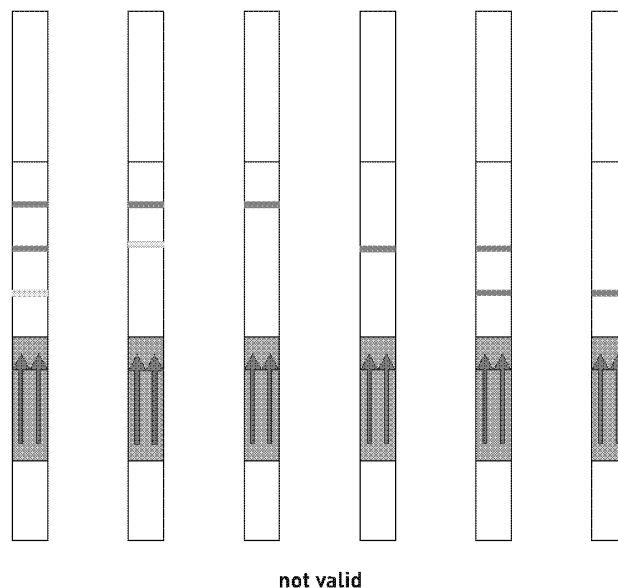
The following alleles are not detected: HLA-B*27 allele 01, 18, 23, 26, 29, and 31.

The figure below shows possible valid banding patterns:



Note: The band intensities displayed in the figure above do not provide reference signal strengths for evaluation of test results, but intend to give an impression of the possible variety of band intensities.

The figure below shows possible banding patterns representing invalid results:



Note: The band intensities displayed in the figure above do not provide reference signal strengths for evaluation of test results, but intend to give an impression of the possible variety of band intensities.

Limitations

The test was validated for usage of EDTA and citrate blood. The user is in charge of validating the applicability of this assay for other sample materials.

With the sequence specific primers and probes used in this assay the following HLA-B*27 alleles are detected: 02 to 17, 19 to 21, 24, 25, 27, 28, 30, and 32 to 36. From those, the following subtypes were detected *in vitro*: HLA-B*2702, 03, 04, 05, 0508, 10, 14, 16, 27, and 34. Due to their rare occurrence and/or their homologies to subtypes already detected *in vitro*, the following alleles are only detected theoretically (*in silico*): HLA-B*2706 to 09, 11 to 13, 15, 17, 19 to 21, 24, 25, 28, 30, 32, 33, 35, 36.

It remains questionable whether the following subtypes, which could not be tested due to their rare occurrence, will yield a positive result or not, as their sequence does not fully match the primers and probes used in this assay: HLA-B*2701, 18, 23, 26, 29, and 31. Hence, they are rated as not detectable.

As with other diagnostic assays, the results of this direct test may only be interpreted in combination with additional laboratory and clinical data available to the responsible physician.

Prior to amplification, human DNA has to be extracted by a suitable method (see chapter DNA Extraction). It must be ensured that the template DNA is efficiently amplified during the amplification reaction.

The test only works within the limits of the genomic regions the primers and probes were chosen from. Potential sequence analysis remains reserved to resuming investigations. As with any detection system on hybridization basis the test system on hand bears the theoretical possibility that very rare sequence variations in the genomic regions the primers and probes were chosen from and the detection of which the test was not designed for may lead to false results. Due to the high variability of the HLA system it is possible that certain types or sub-types are wrongly identified as positive or negative. The test reflects the state of knowledge of Hain Lifescience.

Use of this assay is limited to qualified personnel well trained in the test procedure and familiar with molecular biological methods.

The performance evaluation of this test system was carried out using the HotStarTaq DNA Polymerase from Qiagen. For DNA extraction, the **GenoType DNA Isolation Kit** from Hain Lifescience, the QIAamp DNA Min kit from Qiagen and the **GENO•CARD** from Hain Lifescience were used. Since the performance characteristics of this kit have not been validated for all polymerases and DNA extraction kits commercially available, the user is in charge of validating the applicability of polymerases and extraction kits other than those mentioned above.

Performance data of the assay can be requested through: www.hain-lifescience.com

Troubleshooting

Overall weak or no signals including Conjugate Control

- Too little or too much Running Buffer added to tube.
- Too much amplicon added to Running Buffer.
- Dipstick not correctly dipped into Running Buffer.

No or weak Sample Control

- No or too little DNA added to the amplification reaction.
- Amplicon not denatured and hybridized. Repeat hybridization (see chapter Amplification).
- Time between denaturation and detection longer than 30 minutes or samples were warmed above room temperature. Repeat hybridization (see chapter Amplification).
- No or too little amount of amplicon added to Running Buffer.
- Quality and/or quantity of extracted DNA do not allow an efficient amplification. Repeat DNA extraction and amplification reaction; if necessary, try a different DNA extraction method (see chapter DNA Extraction).
- DNA concentration used for amplification too high resulting in an inhibition of detection.

Unexpected result

- Contamination of extracted DNA and/or amplification agents with extracted and/or amplified DNA. In case amplification agents are contaminated, a contamination control also shows the respective banding pattern.
- Contamination of neighboring tubes by spillage during addition of amplicon.
- Due to a very similar DNA sequence, a HLA-B gene present in the sample generates a weak false positive HLA-B27 band (see chapter Evaluation and Interpretation of Results). The test result is not valid and additional methods have to be applied to identify the respective allele.
- Due to minor mismatches in the DNA sequence, a HLA-B*27 allele present in the sample generates only a weak HLA-B27 band (see chapter Evaluation and Interpretation of Results). The test result is not valid and additional methods have to be applied to identify the respective allele.

Material Required but not Provided

- Adjustable pipettes for 10, 20, 200, and 1000 μ l
- Disposable gloves
- Disposable sterile pipette tips with filter
- DNA extraction kit for amplification use as well as necessary reagents and equipment
- PCR tubes, DNase and RNase free
- Sodium hypochlorite solution (household bleach without dyes and scents)
- Thermal cycler (heating rate: 3°C/sec, cooling rate: 2°C/sec, precision: $\pm 0.2^\circ\text{C}$)
- Thermostable DNA polymerase with buffer (recommendation: hot start enzyme, extension rate: 2-4 kb/min at 72°C, half-life: 10 min at 97°C, 60 min at 94°C, amplification efficiency: $>10^5$ fold)
- Timer
- Water (molecular biology grade)



Kit Contents

	Supplied	
Dipsticks coated with specific probes (DS GQ HLA-B27)	12	96
Primer Nucleotide Mix (PNM GQ HLA-B27) contains oligonucleotides, nucleotides, dye	0.5 ml	4 ml
Positive Control DNA (HCD GQ HLA-B27) <i>ready to use</i> contains 5-20 ng/μl human DNA	0.025 ml	0.025 ml
Running Buffer (RB) <i>ready to use</i> contains buffer, <1% NaCl <1% anionic tenside	2 ml	16 ml
test rack with 96 tubes, manual	1 of each	1 of each
evaluation sheet	1	4

Ordering Information

Starter Set Punch (punch incl. 5 punching mats)	order no. G002
Spare Tip Set (punch tip incl. 5 punching mats)	order no. PR027
GENO•CARD for 3x 4 samples	order no. G001
GENO•CARD for 24x 4 samples	order no. G00196

ANEXO C – IOTest Beckman Coulter – Conjugated Antibodies, HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE

IOTest® HLA-B27-FITC/ HLA-B7-PE REF A07739 50 tests ; 1 mL 20 µL / test  IOTest Conjugated Antibodies <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">IVD</div> <div style="margin-left: 10px;"></div>	ENGLISH	
	Specification of constituent 1	Specification of constituent 2
Specificity	HLA-B27	HLA-B7
Clone	HLA-ABC-m3	BB7.1
Hybridoma	NS1 x Balb/c	NS1 x Balb/c
Immunogen	HLA-B27 antigen partially purified, extracted from the Bordin line (HLA-B27*)	HLA-A2, B7 antigen partially purified, obtained by papain cleavage
Immunoglobulin	IgG2a	IgG1
Species	Mouse	Mouse
Source	Ascites	Ascites
Purification	Chromatography	Chromatography
Fluorochrome	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	R Phycocerythrin (PE)
λ excitation	488 nm	488 nm
Emission peak	525 nm	575 nm
Buffer	PBS pH 7.2 plus 2 mg / mL BSA and 0.1% NaN ₃	

USE

This fluorochrome-conjugated antibody mixture permits the identification and numeration of cell populations expressing the HLA-B27 antigen present in human biological samples using flow cytometry.

The role of the HLA-B7 specificity monoclonal antibody is to demonstrate the presence of this antigen, the main cause of the cross-reaction of the clone recognizing the HLA-B27 antigen (1, 2).

Not for use in the determination of HLA-B tissue group.

PRINCIPLE

This test is based on the ability of specific monoclonal antibodies to bind to the antigenic determinants expressed by leucocytes on the surface.

Specific staining of the leucocytes is performed by incubating the sample with the IOTest reagent. The red cells are then removed by lysis and the leucocytes, which are unaffected by this process, are analyzed by flow cytometry.

The flow cytometer measures light diffusion and the fluorescence of cells. It makes possible the delimitation of the population of interest within the electronic window defined on a histogram, which correlates the orthogonal diffusion of light (Side Scatter or SS) and the diffusion of narrow-angle light (Forward Scatter or FS). Other histograms combining two of the different parameters available on the cytometer can be used as supports in the gating stage depending on the application chosen by the user.

The fluorescence of the delimited cells is analyzed in order to distinguish the positively-stained events from the unstained ones. In this test, in contrast to the great majority of other cytometry tests, HLA-B27 phenotyping is confirmed by comparing the intensities of fluorescence of the test sample in relation to the fluorescence intensities of the certified samples HLA-B27* and HLA-B27*.

EXAMPLES OF CLINICAL APPLICATIONS

Antigens HLA-B27 and HLA-B7 belong in the cross-reaction group B7 (CREG HLA-B7). Among the other HLA-B antigens belonging to CREG HLA-B7, B42 and B22 can be cited (subdivided into B54, B55 and B56), B40 (subdivided into B60 and B61), as well as B41, B47 and B13 (3). The HLA-ABC-m3 monoclonal antibody recognizes the HLA-B27 antigen. It crosses with the HLA-B7 antigen (4) and can also become fixed, but in a less refined manner, to the other antigens of CREG HLA-B7. The BB7.1 monoclonal antibody recognizes the HLA-B7 antigen (5, 6). Though highly specific, it crosses with the HLA-B42 antigen (2). The HLA-

B27 antigens, for which 15 alleles (B*2701-15) have been found (7), and HLA-B7, for which 11 alleles (B*0702-12) have been found (7), are expressed in 7% and 22% of individuals of Caucasian origin (8, 9).

This mixture permits the characterization of HLA-B27 specificity in the HLA class I allotype in patients suffering from inflammatory disorders affecting the sacroiliac and intervertebral joints. This finding aids in the diagnosis of ankylosing spondylitis 90% of sufferers of which express the HLA-B27 antigen, versus 7% in the normal population (10 – 13).

STORAGE AND STABILITY

The conjugated liquid forms must be kept at between 2 and 8°C and protected from light, before and after the vial has been opened. Stability of closed vial: see expiry date on vial. Stability of opened vial: the reagent is stable for 90 days.

PRECAUTIONS

1. Do not use the reagent beyond the expiry date.
2. Do not freeze.
3. Let it come to room temperature (18 – 25°C) before use.
4. Minimize exposure to light.
5. Avoid microbial contamination of the reagents, or false results may occur.
6. Antibody solutions containing sodium azide (NaN₃) should be handled with care. Do not take internally and avoid all contact with the skin, mucosa and eyes. Moreover, in an acid medium, sodium azide can form the potentially dangerous hydrazoic acid. If it needs to be disposed of, it is recommended that the reagent be diluted in a large volume of water before pouring it into the drainage system so as to avoid the accumulation of sodium azide in metal pipes and to prevent the risk of explosion.
7. All blood samples must be considered as potentially infectious and must be handled with care (in particular: the wearing of protective gloves, gowns and goggles).
8. Never pipette by mouth and avoid all contact of the samples with the skin, mucosa and eyes.
9. Blood tubes and disposable material used for handling should be disposed of in ad hoc containers intended for incineration.

SAMPLES

This test can just as readily be undertaken on whole blood as on cells separated on a density gradient. Venous blood or bone marrow samples must be taken using sterile tubes containing an EDTA salt as the anticoagulant. The use of other anticoagulants is not recommended.

The samples should be kept at room temperature (18 – 25°C) and not shaken. The sample should be homogenized by gentle agitation prior to taking the test sample. The samples must be analyzed within 24 hours of venipuncture.

METHODOLOGY

NECESSARY MATERIAL NOT SUPPLIED

- Sampling tubes and material necessary for sampling.
- Automatic pipettes with disposable tips for 20, 100 and 500 µL.
- Plastic haemolysis tubes.
- Calibration beads: Flow-Set™ Fluorospheres (Ref. 6607007).
- Red cell lysis reagent with washing stage after lysis. For example: IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799).
- Fixation reagent: IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800).
- Isotypic control: A mixture of IgG2a-FITC and IgG1-PE, both from mouse.
- Compensation adjustment reagent: A mixture of CD8-FITC and CD4-PE monoclonal antibodies.
- Control blood: IMMUNO-TROL™ Control Cells (Ref. 6607077).
- Buffer (PBS): 0.01 M sodium phosphate; 0.145 M sodium chloride; pH 7.2).
- Centrifuge.
- Automatic agitator (Vortex type).
- Flow cytometer.

PROCEDURE

The clinical responses given by this test depend upon the intensity of fluorescence; these being markedly dependent upon compensation adjustments, it is essential to allow with each analysis series for a tube for the verification of these adjustments. For this verification, refer to the section: **CYTOMETRIC ADJUSTMENTS**. For each sample analyzed, in addition to the test tube, one control tube is required in which the cells are mixed in the presence of an isotypic control.

1. Add 20 µL of specific IOTest conjugated antibodies to each test tube, and to each control tube, the necessary amount of the isotypic control.
2. Add 100 µL of the test sample to the 2 tubes. Vortex the tubes gently.
3. Incubate for 15 to 20 minutes at room temperature (18 – 25°C), protected from light.
4. Then perform lysis of the red cells, if necessary, by following the recommendations of the lysis reagent used. By way of example, if one wishes to use the IOTest 3 Lysis Solution (Ref. A07799), add 2 mL of this reagent at its working concentration (1X). Vortex

- immediately and incubate for 10 minutes at room temperature, protected from light. If the sample does not contain red cells, replace the lysis with 2 mL of PBS.
- Centrifuge for 5 minutes at 300 x g at room temperature.
 - Remove the supernatant by aspiration.
 - Resuspend the cell pellet using 3 mL of PBS.
 - Repeat step 5.
 - Remove the supernatant by aspiration and resuspend the cell pellet using:
 - 0.5 mL or 1 mL of IOTest 3 Fixative Solution (Ref. A07800) at its working concentration (1X), if the preparations are to be kept for more than 2 hours and for less than 24 hours,
 - 0.5 mL or 1 mL of PBS without formaldehyde, if the preparations are to be analyzed within 2 hours.

NOTE: In all cases, keep the preparations between 2 and 8°C and protected from light.

CYTOMETRIC ADJUSTMENTS

This cytometric adjustment procedure should be fully carried out only at the time of the first use of the reagent. On the other hand, the compensation adjustments, which are described here, need to be repeated prior to each series of analyses.

NECESSARY MATERIAL NOT SUPPLIED

For the first use of this reagent, adjustment of the cytometer can only be carried out on blood for which the HLA phenotype is fully documented. Obtain samples of the following blood:

- Whole blood with an HLA-B27⁺ B7⁻ phenotype.
- Whole blood with an HLA-B27⁺ B7⁺ phenotype.
- Whole blood with an HLA-B27⁻ B7⁺ phenotype.
- Whole blood with an HLA-B27⁻ B7⁻ phenotype.

PREPARATION OF SAMPLES REQUIRED FOR ADJUSTMENTS

Tubes for blood with a known HLA typing

For each of these 4 samples prepare a test tube and a control tube by following the staining procedures in section: METHODOLOGY/PROCEDURE.

Tube for compensation adjustments

Prepare a tube for compensation adjustment by staining the blood of a healthy donor or the Immuno-Trol (Ref. 6607077) control blood with the CD8-FITC/CD4-PE mixture by following the procedure given in the section: METHODOLOGY / PROCEDURE, in which, firstly the tube for the isotypic control is omitted and secondly, the volume of antibody used is that recommended by the manufacturer of the mixture for 100 µL of blood.

PHOTOMULTIPLICATOR ADJUSTMENT

Analyze the blood control tube HLA-B27⁻ B7⁻ and adjust the FITC and PE signals (logarithmically amplified) so that the intensity of fluorescence in a biparametric FITC histogram versus PE, undertaken on lymphocytes, is in the first decade counter as shown in the histogram in figure 1.

Analyze the HLA-B27⁻ B7⁻ blood test tube and check that the histogram obtained is comparable to that of figure 2. Adjust the quadrants so that 98% of the lymphocytic population is in quadrant 3.

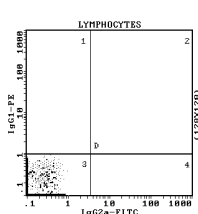


Figure 1 Control tube of HLA-B27⁻ B7⁻ blood

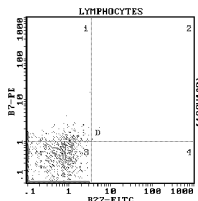


Figure 2 Test tube of HLA-B27⁻ B7⁻ blood

COMPENSATION ADJUSTMENTS

Analyze the tube stained with the CD8-FITC/CD4-PE mixture and adjust the fluorescence compensations such that, in the FITC versus PE histogram, the means of the fluorescence intensities are identical along the Y axis in quadrants 3 and 4 and identical along the X axis in quadrants 1 and 3.

CONTROL OF FLUORESCENCE THRESHOLDS

This control is carried out with blood of known HLA typing.

Sample HLA-B27⁺ B7⁻

Analyze the HLA-B27⁺ B7⁻ blood control tube. The histogram obtained must be comparable to that of Figure 1.

Analyze the HLA-B27⁺ B7⁻ blood test tube. The histogram obtained must be comparable to that of Figure 3 where all the lymphocytes are found in quadrant 4.

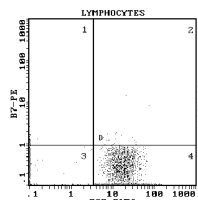


Figure 3 Test tube of HLA-B27⁺ B7⁻ blood

Sample HLA-B27⁻ B7⁺

Analyze the HLA-B27⁻ B7⁺ blood control tube. The histogram obtained must be comparable to that of figure 1.

Analyze the HLA-B27⁻ B7⁺ blood test tube. The histogram obtained should resemble that of Figure 4.

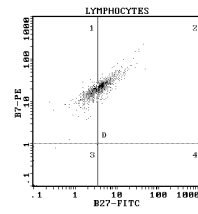


Figure 4 Test tube of HLA-B27⁻ B7⁺ blood

The lymphocytic population is straddled between quadrants 1 and 2. This situation is entirely normal and no attempt should be made to try and compensate for it. It is due to the fact that the HLA-ABC-m3 monoclonal antibody crosses with the HLA-B7 phenotype. A fraction of the HLA-B7 epitopes is occupied by the HLA-ABC-m3 antibody. A lymphocytic population completely contained within quadrant 1 is also possible. It corresponds to the case in which the HLA-ABC-m3 monoclonal antibodies do not cross with the HLA-B7 epitopes.

Sample HLA-B27⁺ B7⁺

Analyze the HLA-B27⁺ B7⁺ blood control tube. The histogram obtained should be comparable with that of Figure 1.

Analyze the HLA-B27⁺ B7⁺ blood test tube. The histogram obtained should be comparable to that of Figure 5.

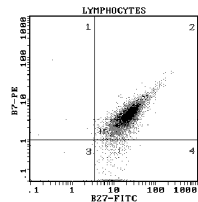


Figure 5 Test tube of HLA-B27⁺ B7⁺ blood

Sample HLA-B27⁻ B7⁻

Analyze the control tube of HLA-B27⁻ B7⁻ blood. The histogram obtained should be comparable to that of Figure 1.

Analyze the test tube of HLA-B27⁻ B7⁻ blood. The histogram obtained should be comparable to that of figure 2.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

All lymphocytic populations completely contained within quadrant 3 can be considered as being HLA-B27⁻ (and HLA-B7⁻).

All lymphocytic populations completely contained within quadrant 1 can be considered as being HLA-B27⁺ (and HLA-B7⁺).

All lymphocytic populations completely contained within quadrant 4 can be considered to be HLA-B27⁺ providing the quadrants have been positioned, not on an isotypic control, but over an HLA-B27⁻ B7⁻ sample.

All lymphocytic populations straddling quadrants 3 and 4 have a high probability of being HLA-B27⁺ (and HLA-B7⁻).

However, a confirmatory microlymphocytotoxicity test or using PCR is essential.

All lymphocytic populations straddling quadrants 1 and 2 have a high probability of being HLA-B27⁻ (and HLA-B7⁺).

However, a confirmatory microlymphocytotoxicity test or using PCR is essential. All lymphocytic populations contained within quadrant 2 have a high probability of being HLA-B27⁺ (and HLA-B7⁺). However, a confirmatory microlymphocytotoxicity test or using PCR is essential.

PERFORMANCE SPECIFICITY

The specificity of the HLA-ABC-m3 monoclonal antibody vis-à-vis the HLA-B27 antigen has been studied by Trapani, J.A. *et al.* (4) and that of the BB7.1 monoclonal antibody by Brodsky, F.M. *et al.* (5).

LINEARITY

A linearity test of staining has no biological significance as in a given individual either 100% of cells are HLA-B27⁺ or 100% are HLA-B27⁻. On the other hand, such a reagent must show in HLA-B27⁻B7⁻ donors a mean fluorescence intensity (MFI) for lymphocytes, both with regard to HLA-B27 specificity as well as to HLA-B7 specificity, which is much lower to that obtained in HLA-B27⁺B7⁺ donors. This is reflected by the MFI⁺/MFI⁻ ratios calculated from the mean of 12 determinations of MFI from an HLA-B27⁺B7⁺ (MFI⁺) donor and from an HLA-B27⁻B7⁻ (MFI⁻) donor shown in the following table.

Lymphocytes	Number	Mean (MFI)	CV (%)	MFI ⁺ /MFI ⁻ ratio
HLA-B27 ⁺	12	29.6	2.2	114
HLA-B27 ⁻	12	0.26	2.4	
HLA-B7 ⁺	12	33.9	1.7	168
HLA-B7 ⁻	12	0.20	1.7	

EXPECTED VALUES

Non applicable

INTRA-LABORATORY REPRODUCIBILITY

As the allocation of a subject to the HLA B27 specificity group, being based upon the measurement of the intensity of fluorescence of each lymphocyte analyzed and not on the percentage of stained lymphocytes, the study of the intra-laboratory reproducibility is based on the MFI of this population.

On the same day and using the same cytometer, 12 measurements of the MFI of lymphocytes from an HLA-B27⁺B7⁺ donor were undertaken. The results obtained are summarized in the following table.

Lymphocytes	Number	Mean (MFI)	SD	CV (%)
HLA-B27	12	29.6	0.65	2.2
HLA-B7	12	33.9	0.56	1.7

INTER-LABORATORY REPRODUCIBILITY

On the same day and for the same positive target (HLA-B27⁺B7⁺ lymphocytes), 12 measurements of the MFI of the lymphocytes were carried out by two technicians and the preparations analyzed using two different cytometers. The results obtained are summarized in the following tables:

Cytometer n° 1:

Lymphocytes	Number	Mean (MFI)	SD	CV (%)
HLA-B27	12	29.6	0.65	2.2
HLA-B7	12	33.9	0.56	1.7

Cytometer n° 2:

Lymphocytes	Number	Mean (MFI)	SD	CV (%)
HLA-B27	12	23.7	0.58	2.5
HLA-B7	12	15.2	0.40	2.6

LIMITATIONS OF THE TECHNIQUE

- Flow cytometry may produce false results if the cytometer has not been aligned perfectly, if fluorescence leaks have not been correctly compensated for and if the regions have not been carefully positioned.
- This reagent must not be diluted, aliquoted or frozen. Do not use beyond the expiry date shown on the flask.
- Phycoerythrin (PE) is sensitive to light and all incubations must take place away from light.
- It is preferable to use a RBC lysis technique with a washing step as this reagent has not been optimized for "no wash" lysis techniques.
- Accurate and reproducible results will be obtained as long as the procedures used are in accordance with the technical insert leaflet and compatible with good laboratory practices.
- The conjugated antibodies of this reagent are calibrated so as to offer the best specific signal/non-specific signal ratio. Therefore, it is important to adhere to the reagent volume/sample volume ratio in every test.

- In the case of a hyperleucocytosis, dilute the blood in PBS so as to obtain a value of approximately 5×10^5 leucocytes/L.
- In certain disease states, such as severe renal failure or haemoglobinopathies, lysis of red cells may be slow, incomplete or even impossible. In this case, it is recommended to isolate mononucleated cells using a density gradient (Ficoll, for example) prior to staining.
- The demonstration of an HLA-B27 phenotype in a patient does not signify that the latter is suffering from an ankylosing spondylitis. Conversely, only 90% of affected patients are HLA-B27⁺.

POSSIBLE INTERFERENCES

(CROSS REACTIONS)

- The HLA-ABC-m3 monoclonal antibody, which recognizes the HLA-B27 antigen, crosses with the HLA-B7 antigen (4) and, to a lesser extent, with CREG HLA-B7 antigens.
 - On the other hand, the BB7.1 monoclonal antibody, which recognizes the HLA-B7 antigen, crosses with the HLA-B42 antigen HLA-B42 (2, 5).
 - The demonstration by the present reagent of a double HLA-B27⁺ and HLA-B7⁺ related positivity may be the result of different expressions:
 - the heterozygotic expression of the HLA-B27 / HLA-B7 genotype,
 - the heterozygotic expression of the HLA-B7 / HLA-B7 genotype or,
 - the homozygotic expression of the HLA-B7 / HLA-B7 genotype.
- A confirmatory test using microlymphocytotoxicity or PCR must therefore be undertaken.

MISCELLANEOUS

See the Appendix for references.

TRADEMARKS

The Beckman Coulter logo, COULTER, EPICS, EXPO, Flow-Set, IMMUNO-TROL, iOTest, System II, and XL are the registered trademarks of Beckman Coulter Inc.

MANUFACTURED BY:

IMMUNOTECH SAS
a Beckman Coulter Company
130 avenue de Lattre de Tassigny
B.P. 177 – 13276 Marseille Cedex 9
France
Customer Services: (33) 4 91 17 27 27

www.beckmancoulter.com



APPENDIX TO REF A07739

REFERENCES

1. Ulrich, G., "Utilisation de la cytométrie en flux pour le phénotypage HLAB27 : étude d'une technique de double marquage HLA B7 / HLA B27", 1997, Allergie et Immunologie, 1, 29, 11-14.
2. Colombani, J., "HLA : Fonctions immunitaires et applications médicales", 1992, Clé pour M/S. John Libbey Eurotext., Chap 2, 31-37.
3. Lee, T.D., Zhao, T.M., Strothman, R., "First Red Cross histocompatibility workshop", 1990, The HLA system. A new approach., Chap 5, Lee Editor, 107-139.
4. Trapani, J.A., Vaughan, H.A., Sparrow, R.L., Tait, B.D., McKenzie, I.F.C., "Description of a mouse monoclonal anti-HLA-B27 antibody HLA-ABC-m3", 1983, Hum. Immunol., 7, 205-216.
5. Brodsky, F.M., Parham, P., Barnstable, C.J., Crumpton, M.J., Bodmer, W.F., "Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system", 1979, Immunological Rev., 47, 1-61.
6. Trapani, J.A., Vaughan, H.A., Tait, B.D., Mc Kenzie, I.F.C., "Immunoradiometric assay for the rapid detection of HLA-B27", 1988, Immunol. Cell. Biol., 66, 215-219.
7. Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Dupont, B., Erlich, H.A., Hansen, J.A., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Petersdorf, E.W., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.Th., Strominger, J.L., Sveigaard, A., Terasaki, P.I., "Nomenclature for factors of the HLA System, 1998", 1999, Human Immunology, 60, 361-395.
8. Colombani, J., "HLA : Fonctions immunitaires et applications médicales", 1992, Clé pour M/S. John Libbey Eurotext., Chap 3, 39-47.
9. Lee, T.D., "Distribution of HLA antigens : distribution of HLA antigens in north american caucasians, north american blacks and orientals", 1990, The HLA system, a new approach., Chap 6, John Lee Editor, 141-236.
10. Fizet, D., "Identification de l'antigène HLA B27 par cytométrie de flux", 1989, Ann. Bilo. clin., 47, 408-411.
11. Feltkamp, T.E.W., Khan, M.A., Lopez de Castro, J.A., "The pathogenetic role of HLA-B27", 1996, Immunol. Today, 1, 17, 5-7.
12. Bodmer, J., "World distribution of HLA alleles and implications for disease", 1996, Ciba Foundation Symposium, 197, 233-258.
13. Lopez-Larrea, C., Gonzalez-Roces, S., Alvarez, V., "HLA-B27 structure, function and disease association", 1996, Curr. Opin. Rheumatol., 8, 296-308.

ANEXO D – IOTest Beckman Coulter – Analyze Specific Reagent, IgG2a (MOUSE)-FITC/IgG1 (MOUSE)-PE.

IOtest® IgG2a (Mouse)-FITC / IgG1 (Mouse)-PE

PN IM1255U – 1 mL Liquid – 20 µL / test*

Analyte Specific Reagent.

Analytical and performance characteristics are not established.

REAGENT COMPONENTS

	Specifications of constituent 1	Specifications of constituent 2
Specificity	N/A	N/A
Clone	U7.27	679.1Mc7
Hybridoma	P3-X63-Ag.8.653 x Balb/c	P3-X63-Ag.8.653 x Balb/c
Immunogen	Non-biological hapten	Non-biological hapten
Ig Chain	IgG2a	IgG1
Species	Mouse	Mouse
Source	Ascites fluid	Ascites fluid
Purification	Ion exchange or affinity chromatography	Ion exchange or affinity chromatography
Conjugation	FITC (Fluorescein isothiocyanate)	PE (Phycoerythrin)
Molar Ratio	FITC / Ig: 5 – 8	PE / Ig: 0.5 – 1.5
λ Excitation range	468 – 509 nm	486 – 580 nm
λ Emission range	504 – 541 nm (green)	568 – 590 nm (Orange)
Buffer	PBS (pH 7.2) plus 2 mg / mL BSA and 0.1% NaN ₃	

SPECIFICITY

Hematopoietic cell differentiation is characterized by the expression of distinct membrane antigens at specific stages of the cellular maturation. These antigens expressed on the membrane are identified by specific monoclonal antibodies.

Certain monoclonal antibodies (mAb) have irrelevant specificities. They induce nonspecific immuno-labeling on hematopoietic cells and platelets.

The FITC-conjugated U7.27 mAb and PE-conjugated 679.1Mc7 mAb share certain structural characteristics (i.e. isotype and conjugated fluoro-chrome) with monoclonal antibodies of interest, but are devoid of any relevant specificities with regard to the studied cell population (1).

REAGENT

IOtest Conjugated Antibodies
IgG2a (Mouse)-FITC / IgG1 (Mouse)-PE
PN IM1255U – 1 mL liquid – 20 µL / test*.

STATEMENT OF WARNINGS

1. This reagent contains 0.1% sodium azide. Sodium azide under acid conditions yields hydrazoic acid, an extremely toxic compound. Azide compounds should be flushed with running water while being discarded. These precautions are recommended to avoid deposits in metal piping in which explosive conditions can develop. If skin or eye contact occurs, wash excessively with water.

2. Do not use reagent beyond the expiration date on the vial label.
3. All specimens and samples must be considered as potentially infectious and must be handled with care (in particular: the wearing of protective gloves, gowns and goggles).
4. Do not expose reagents to strong light during storage or incubation.
5. Avoid microbial contamination of reagents or incorrect results might occur.
6. Avoid contact of samples with skin mucosa and eyes. Never pipet by mouth.
7. Let it come to room temperature (18 – 25°C) before use.
8. Use general good laboratory practices when handling this reagent.

STORAGE CONDITIONS AND STABILITY

This reagent is stable up to the expiration date when stored at 2 – 8°C. Do not freeze. Minimize exposure to light.

EVIDENCE OF DETERIORATION

Any change in the physical appearance of this FITC- and PE-labeled combination (clear, yellowish-green to pinkish liquid) or any major variation in values obtained for control samples may indicate deterioration and the reagent should not be used.

REAGENT PREPARATION

No reconstitution is necessary. This monoclonal antibody may be used directly from the vial. Bring reagent to 18 – 25°C prior to use.

SELECTED RESEARCH REFERENCES

1. Stewart, C.C., Stewart, S.J., "Cell preparation for the identification of leukocytes", 1994, Methods Cell Biol., Chap.3, 41, 39-60.

PRODUCT AVAILABILITY

IOtest Conjugated Antibodies
IgG2a (Mouse)-FITC / IgG1 (Mouse)-PE
PN IM1255U – 1 mL liquid – 20 µL / test*.

PE is licensed under patent 4,520,110.

For additional information in the USA, call 800-526-7694.

Outside the USA, contact your local Beckman Coulter representative.

www.beckmancoulter.com

TRADEMARKS

The Beckman Coulter logo and IOtest are registered trademarks of Beckman Coulter Inc.

Manufactured by:
ImmunoTech SAS, a Beckman Coulter Company
130, avenue de Lattre de Tassigny, B.P. 177
13276 Marseille Cedex 9, France

Copyright® Beckman Coulter, Inc. 2007
All Rights Reserved.

(*): 20 µL is the quantity of product sufficient to stain
5 x 10⁵ cells in a standard immunofluorescence assay

Page 1 of 1

IM1255U 2007-04-11



ANEXO E – Exemplos de Resultados Obtidos por Citometria de Fluxo

– Controlo Negativo –

LABORATORIO DR HILARIO DE LIMA

COULTER(R) EPICS(R) Listmode Replay Flow Cytometry Report
CHXLMD:Z0023448.LMD, XL W44347, Run time protocol

OPID: AC

10Aug11 18:06:21

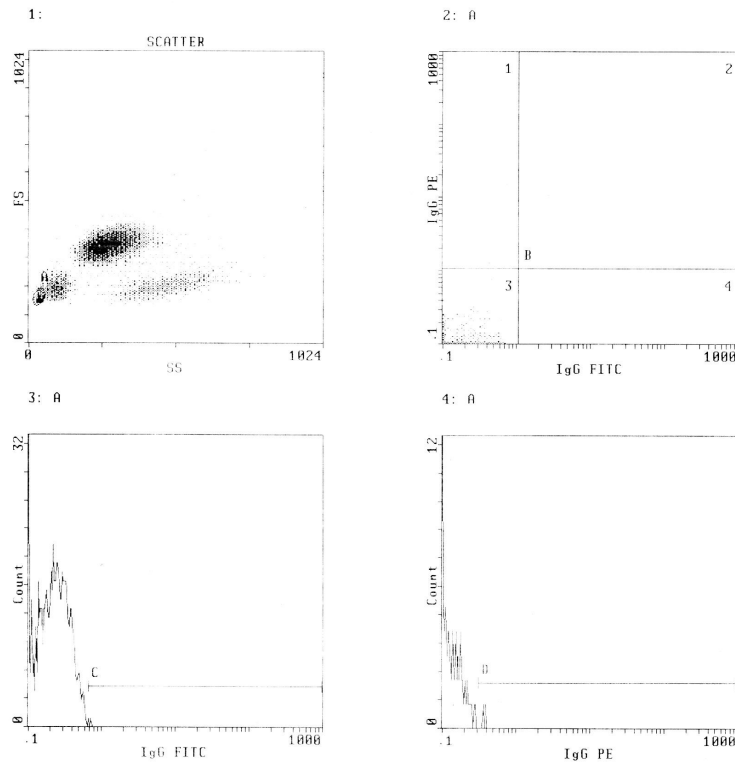
IgG-IgG

Z0023448

1533074

300 seconds, 78435 events

Stop Time: 300 secs



Gate: Normalized, Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mnl X	Mnl Y
1	A AUTO	4.53	3554	36.1	156.4
2	B1 B	0.03	1	0.448	1.32
	B2 B	0.00	0	****	****
	B3 B	100	3553	0.211	0.111
	B4 B	0.00	0	****	****

Hist	Region ID	%	Count	Mnl X
3	C C	0.20	7	0.773
4	D D	0.31	11	0.510

– Amostra Teste –

LABORATORIO DR HILARIO DE LIMA

COULTER(R) EPICS(R) Listmode Replay Flow Cytometry Report
C:\XL(LMD)\Z0023449.LMD, XL W44347, Run time protocol

CP ID: AC

10Aug11 18:11:40

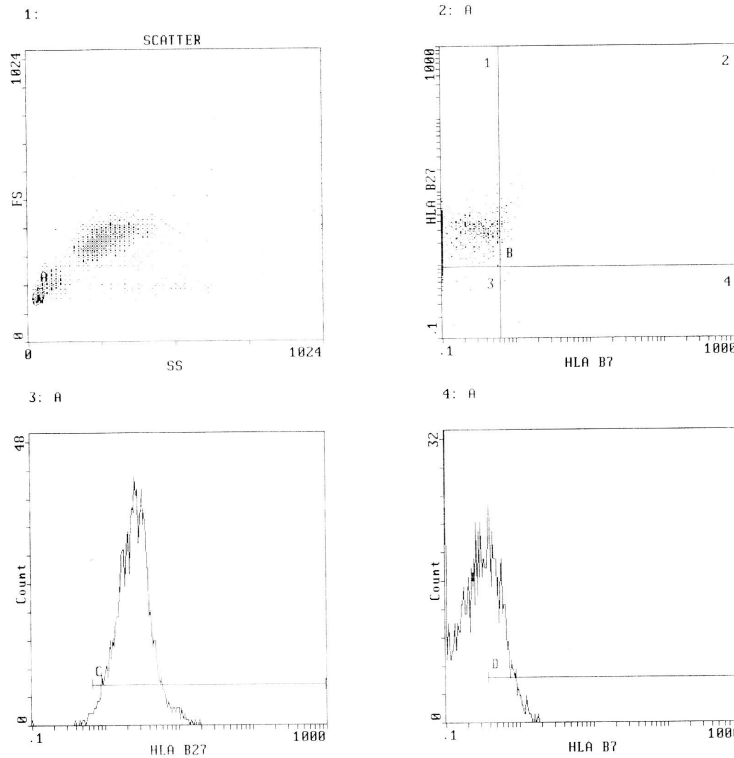
HLA B27-HLA B7

Z0023449

1533074

168 seconds, 45705 events

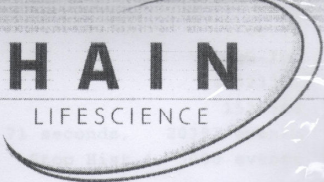
Stop Hist 4, 5000 events



Stats: Normalized, Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mnl X	Mnl Y
1	A AUTO	10.9	5000	34.5	156.3
2	B1 B	86.3	4316	0.245	2.93
	B2 B	9.04	452	0.887	5.50
	B3 B	4.46	223	0.199	0.784
	B4 B	0.18	9	0.784	0.604
Hist	Region ID	%	Count	Mnl X	
3	C C	98.8	4939	3.09	
4	D D	28.6	1429	0.620	


ANEXO F – Digitalização das Tiras de Detecção da PCR – GenoQuick

















GenoQuick® HLA-B27 96

VER 2.0
00311-0508-03-1

LOT

 *200007*

12 08 2011
dd mm yyyy

#			 <i>C. homotopia</i>	CC	SC	HLA-B27
1	1529584		Negativo	x	x	
2	1529614		Negativo	x	x	x
3	1529786		Negativo	x	x	x
4	1530397		Negativo	x	x	x
5	1530400		Negativo	x	x	
6	1531682		Negativo	x	x	
7	1532297		Positivo (98.5%)	x	x	x
8	1532548		Negativo	x	x	
9	1532554		Negativo	x	x	x
10	1532602		Negativo	x	x	x
11	1533074		Positivo (98.8%)	x	x	x
12	1533188		Negativo	x	x	x
13	1533304		Negativo	x	x	
14	1534069		Negativo	x	x	
15	1534083		Negativo	x	x	x
16	1534440		Negativo	x	x	x
17	1534475		Positivo (92.6%)	x	x	x
18	1524101		Negativo	x	x	x
19	1525131		Negativo	x	x	x
20	1530349		Negativo	x	x	x
21	C. Positivo			x	x	x
22	C. Negativo			x	/	